UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1962-1963 N° 826

Étude des Propriétés des Toxines Staphylococciques par Immuno-Électrophorèse

Leur rapport avec la Pantothénothérapie

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 8 janvier 1963
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

CHRISTOPH KESSELRING
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur
J. MEYER, Maître de conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1962

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1962-1963 N° 826

Étude des Propriétés des Toxines Staphylococciques par Immuno-Électrophorèse

Leur rapport avec la Pantothénothérapie

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 8 janvier 1963
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

CHRISTOPH KESSELRING
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur
J. MEYER, Maître de conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1962

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

ADMINISTRATION :

MM. GAZET DU CHATELIER, *Doyen*, I. ✠
SCHREIBER, *Assesseur*, I. ✠
CLADY, *Secrétaire*, I. ✠

PROFESSEURS :

MM.	SARTORY, O. ✠, I. ✠, O. ✠	Bactériologie
	CORDIER, ✠, I. ✠	Pharmacie chimique
	DUQUÉNOIS, ✠, I. ✠, ✠	Matière médicale
	JAEGER, I. ✠, ✠	Botanique
	GAZET DU CHATELIER, I, ✠	Pharmacie galénique
	HASSELMANN, I. ✠	Chimie analytique
	SCHREIBER, I. ✠	Chimie organique
	N	Chimie biologique
	N	Physique

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	LEDOUX, ✠, ✠	Sciences naturelles
	MÉTAIS	Sciences appliquées
	MALGRAS	Sciences naturelles
	LAUSTRIAT	Sciences physico-chimiques

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE :

M. COLLARD

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Éléments de chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	SCHREIBER	Chimie générale
	LAVIGNE	Législation et Déontologie pharmaceutiques
	LEDOUX	Bactériologie pharm. et techn.
	METAIS	Biochimie analyt. et séméiolog.
	MALGRAS	Sérologie
	LAUSTRIAT	Minéralogie et Éléments de mathématiques
	C. F. LAPP	Chimie minérale
	C. MEYER	Comptabilité et fiscalité

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

Mme	KRISTENSEN	Chimie pharmaceutique
M.	MATHIS	Chimie
Mme	OURISSON	Histoire naturelle
MM.	STAHL	Bactériologie et Parasitologie
	C. F. LAPP	Physique
	ROMOND	Bactériologie
	WERMUTH	Chimie

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur R. SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur P. CORDIER

Professeur de Pharmacie Chimique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur J. MEYER

Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A mes Parents,

à qui je dois plus que je ne saurais dire, en faible témoignage de ma reconnaissance et de ma filiale affection

A ma Femme,

avec tout mon amour.

INTRODUCTION

Doué d'une grande ubiquité, présent dans l'air, dans l'eau, dans le sol, à la surface des muqueuses et du revêtement cutané, *le Staphylocoque* dont le clinicien constate journellement la recrudescence et la malignité, *présente un regain d'actualité.* Cette bactérie élabore *une toxine* qui possède de multiples propriétés biochimiques, enzymatiques et sérologiques; elle est responsable chez l'homme comme chez l'animal de nombreuses affections locales ou générales de plus en plus fréquentes. Son rôle dans *l'hygiène alimentaire* devient chaque jour plus redoutable par suite du développement intense de l'industrie des conserves.

Les Staphylocoques, qui ont été les premiers à servir de test pour *l'étude des antibiotiques* (FLEMING), sont devenus progressivement et dans un pourcentage élevé de cas, résistants à *tous les antibiotiques* d'utilisation courante et à large spectre d'action.

Pour affirmer qu'*une affection cutanée ou profonde, ou qu'une intoxication alimentaire a pour cause un Staphylocoque*, il ne suffit pas de mettre en évidence dans un prélèvement *des Coccis Gram-positifs en amas polyétriques, en grappes de raisin*, donnant sur gélose des colonies bombées, luisantes, opaques par transparence, pigmentées ou non, troublant uniformément le bouillon ordinaire avant de donner un dépôt glaireux ou un très léger voile, coagulant le lait, liquéfiant la gélatine, etc.; il faut aussi prouver qu'il ne s'agit pas d'un microbe banal, *d'un Staphylocoque non pathogène*, qui, comme nous le savons, existe fréquemment sur la peau, dans l'intestin et à la surface des diverses cavités naturelles. *Ces germes avirulents* ont une morphologie absolument semblable à celle *des Staphylocoques pathogènes* ; ils ont les mêmes affinités tinctoriales, leurs colonies réciproques présentent le même aspect et la seule différence réside en principe dans le pouvoir pathogène des uns. On a donc essayé de caractériser *les Staphylocoques virulents* par des propriétés biochimiques, enzymatiques et sérologiques et de les différencier ainsi *des Staphylocoques banaux.*

Pour déterminer le caractère *des Staphylocoques pathogènes*, on a actuellement recours à quatre épreuves fondamentales :

— Épreuve positive par inoculation intradermique au lapin;

— Épreuve de l'action coagulante de la bactérie sur le plasma sanguin;

— Épreuve du pouvoir fermentatif sur le Mannitol;

— Réaction au Violet cristallisé.

A. et R. SARTORY et J. MEYER (1) ont décrit le mode opératoire de ces différentes méthodes. ECKNER (2) a pu montrer, *dans le Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, que la caractérisation et le dosage de *la fibrinolysine* peuvent être aussi importants que ceux *de la coagulase* pour la détermination *du pouvoir pathogène des Staphylocoques*. On voit ainsi l'intérêt de la recherche des *quatre antigénes : hémolysines* α et β, *coagulase et fibrinolysine*, pour déterminer l'origine humaine ou animale d'une souche de *Staphylocoques*, fait qui est important surtout en cas de *toxi-infection alimentaire* pour dépister les porteurs de germes et caractériser *les Staphylocoques pathogènes pour l'homme*.

MEYER *et ses collaborateurs* ont pu montrer que *les fibrinolysines staphylococciques* sont des protéines complexes liées à des substances polyhosidiques; elles sont partiellement sécrétées dans le milieu de culture aqueux ambiant et peuvent être concentrées et purifiées par précipitation fractionnée à l'alcool-acétone ou par adsorption sur l'hydroxyde d'alumine. Ce sont des ferments relativement thermostables, à caractères *d'antigènes complets*, strictement spécifiques et indépendants de la coagulase et des α- et β-hémolysines.

On voit ainsi que *les antigènes des Staphylocoques pathogènes* forment une mosaïque de constituants divers.

Ayant eu l'occasion de travailler dans *le Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg* à la même époque que G. RITSCHEL-BEURLIN (3) et F. GUILLAUME (4), nous avons pu profiter de leur expérience en ce qui concerne l'emploi *des méthodes d'immuno-électrophorèse et de sérologie* pour caractériser *les différents facteurs antigéniques en général et les antigènes précipitants en particulier*.

Avant d'entrer dans le vif de notre sujet, nous tenons à remercier ici *Monsieur* R. SARTORY, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, pour l'accueil si aimable qu'il nous a réservé dans son laboratoire et pour le grand honneur qu'il nous fait aujourd'hui en présidant le jury de notre thèse.

Que *Monsieur* P. CORDIER, *Professeur de Pharmacie Chimique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg* trouve ici l'expression de notre gratitude pour la gentillesse avec laquelle il a accepté de siéger dans ce jury.

Toute notre reconnaissance est acquise *à Monsieur* J. MEYER, *Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg ;* après nous avoir suggéré le sujet de notre travail il nous a toujours guidé et encouragé, nous facilitant dans une large mesure la tâche qui nous était fixée.

Nous n'oublions pas non plus l'amabilité et la gentillesse de *Monsieur* J. MALGRAS, *Maître de Conférences de Sciences Naturelles à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, ainsi que tous ceux qu'il nous a été donné de rencontrer dans ce si sympathique *laboratoire de Microbiologie* animé et dirigé par *le professeur* R. SARTORY. Notre amitié leur est acquise, avec notre meilleur souvenir.

PLAN DE TRAVAIL

Le but de notre travail est l'étude du *pouvoir antigénique et antizymatique de la toxine staphylococcique*. Nous avons recours à *la méthode immuno-électrophorétique* pour étudier la production des précipitines spécifiques, apparaissant sous l'*action du vaccin seul ou associé à l'Acide pantothénique*.

Notre exposé comporte deux parties; dans *l'historique* nous réservons un chapitre aux problèmes de l'unicité ou de la pluralité de la *toxine staphylococcique*, tandis que *le Chapitre* II a trait à l'évaluation *du pouvoir pathogène des Staphylocoques* en prenant en considération la production des hémolysines, de la coagulase, de la fibrinolysine, de la gélatinolysine, de la caséinase, des lipases et lécithinases.

La deuxième partie de notre exposé est réservée à nos travaux personnels. Dans le Chapitre III nous donnons en détail la technique de l'*analyse immuno-électrophorétique* en milieu gélosé. Nous insistons sur la purification de la gélose, sur la préparation des plaques; nous décrivons l'appareillage employé et les techniques de coloration et de décoloration. Nous rapportons ensuite la préparation *des immunsérums* en donnant *la technique de vaccination* de lapins à l'aide du milieu R. A. P., substrat de choix pour la toxigenèse. L'immunsérum ainsi obtenu doit nous servir de test de comparaison pour connaître *les précipitines élaborées* à la suite d'injections de toxines staphylococciques. La mise en présence de *ces complexes d'antigènes-anticorps* nous permettra par la suite de mettre au point notre technique immuno-électrophorétique.

Dans le Chapitre IV nous rapportons nos essais au moyen des toxines employées seules ou associées à l'Acide pantothénique. L'ensemble de nos recherches s'étend sur *des immunsérums* préparés par vaccination à l'aide *d'une polytoxine staphylococcique*, puis de *différents mélanges de toxines* à propriétés spécifiques pour *les hémolysines, la fibrinolysine et les lipases staphylococciques*. Chaque groupe de lapins est divisé en deux lots, dont le second reçoit, en plus des injections de toxines, le traitement par *l'Acide pantothénique*. Les différents groupes d'animaux sont doublés pour être traités avec *des toxines analogues, mais dépourvues des propriétés antigéniques* mises à l'épreuve. Ce protocole expérimental doit nous permettre d'élucider, *par comparaison*, la genèse des *différentes précipitines spécifiques*.

Notre travail se termine par *des Conclusions générales*. Nous y insistons particulièrement sur les *différents problèmes immunologiques* qui se sont posés au cours de notre étude.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550001_0025

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

UNICITÉ OU PLURALITÉ DE LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE

La toxine staphylococcique diffuse dans le milieu de culture. Elle représente *un antigène différent de celui contenu dans les corps microbiens.* Ces deux antigènes n'ont, en effet, ni les mêmes propriétés toxiques, ni le même pouvoir antigène. SCHWARTZ a montré, en effet, que *les Staphylocoques desséchés*, réduits en poudre et émulsionnés, ne possèdent aucune des propriétés de la toxine; ils n'hémolysent ni les globules de lapin, ni ceux de mouton, ne donnent pas de nécrose, tuent inconstamment le lapin, et la mort de ce dernier semble sans rapport avec celle due à la toxine. D'autre part, les injections multiples de toxine entraînent la formation d'antitoxines capables de neutraliser la toxine « *in vitro* » comme « *in vivo* », alors que les injections de *Staphylocoques tués* (*vaccin microbien*) ne le font pas (GENGOU, RAMON, RICHOU et DJOURICHITCH). Les antigènes microbiens tués font apparaître des précipitines pour les filtrats de culture mais, malgré la présence de ces précipitines à un titre élevé, les animaux restent sensibles à l'action de la toxine. Au contraire, les lapins vaccinés avec *l'exotoxine ou l'anatoxine* résistent à plusieurs doses mortelles de cette toxine, bien que leur sérum ne précipite que les filtrats contenant de l'exotoxine.

Tous ces faits montrent à l'évidence que *la toxine staphylococcique* est bien une exotoxine et tous les auteurs sont d'accord sur ce point.

Au contraire, la question de *l'unicité ou de la pluralité* de la toxine staphylococcique est très discutée. Certains auteurs ont voulu voir, dans les multiples actions exercées par la toxine staphylococcique, la preuve que les filtrats de culture de Staphylocoques contiennent non pas une seule toxine, responsable de ces diverses actions, mais un certain nombre de substances toxiques, juxtaposées, indépendantes les unes des autres, possédant chacune des propriétés bien définies. Pour ces auteurs, *il n'y aurait donc pas une toxine staphylococcique, mais une leucocidine, une hémolysine, une toxine léthale, une coagulase, une entérotoxine*, etc. Pour

les autres, au contraire, les diverses propriétés des filtrats staphylococciques seraient dues à *une seule et même substance toxique.*

« Si les activités de ces filtrats nous paraissent multiples — écrit Gengou (5) — ce n'est pas parce que chacune d'elles est due à une substance spéciale, c'est parce que nous mettons ces liquides en contact de tests divers : animaux, hématies, leucocytes. »

Pour conclure à *l'unicité ou à la pluralité* de la toxine staphylococcique, les auteurs se sont basés :

1° Sur le moment d'apparition dans les filtrats des diverses propriétés de la toxine;

2° Sur leur persistance;

3° Sur le moment de leur disparition sous l'influence du vieillissement, de la chaleur ou du formol.

4° Sur le pouvoir neutralisant du sérum des animaux vaccinés pour les diverses propriétés de la toxine.

5° Sur les épreuves d'épuisement des propriétés de la toxine par les hématies de lapin.

Les résultats les plus divers et les plus contradictoires ont été obtenus.

Nous envisagerons d'abord le rapport existant entre *les propriétés cytologiques, hémolytiques, dermo-nécrotiques et léthales de la toxine staphylococcique.*

Pour Neisser et Wechsberg (6) *la leucocidine* serait différente de *l'hémolysine.* Ces auteurs prétendent, en effet, que certaines souches peuvent produire de la leucocidine sans sécréter d'hémolysine, que ces deux propriétés n'apparaissent pas en même temps dans les cultures, qu'elles ne persistent pas parallèlement dans les filtrats conservés à la glacière, que les leucocytes peuvent absorber la leucocidine sans fixer l'hémolysine. Julianelle (7) admet également que *le pouvoir hémolytique et la propriété leucocytique* sont dus à des substances distinctes.

Cette opinion est battue en brèche par la constatation que *l'hémolysine, comme la leucocidine,* est détruite par chauffage à 55° et que *la leucocidine, comme l'hémolysine,* se montre antigène, déterminant dans l'organisme l'apparition d'une anti-leucocidine. D'autre part, les résultats des recherches de Gengou plaident en faveur *de l'unicité de l'hémolysine et de la leucocidine.* Cet auteur a montré, en effet, qu'en épuisant un filtrat staphylococcique par contact avec des hématies ou des stromas globulaires de lapin, on prive à la fois le filtrat de toutes ses propriétés toxiques : hémolytique, lytique pour les globules de lapin, les hématoblastes, les cellules des surrénales, léthale pour le lapin injecté par voie veineuse.

Burnet (8) et Burnet et Freeman (9) admettent l'identité *de l'hémolysine, de la dermotoxine et de la toxine léthale.* Ils constatent l'apparition,

puis la disparition simultanée, sous l'influence du formol par exemple, de ces trois propriétés, dans tous les filtrats; le titrage de l'une permet de prévoir l'activité des deux autres. Ils notent d'autre part, que quels que soient la toxine et le sérum utilisés, ce dernier neutralise à la fois les propriétés hémolytique, dermonécrotique et léthale de la toxine. Enfin, *deux Staphylocoques complètement différents*, ne produisent-ils pas de toxines antigéniquement identiques ?

La toxine staphylococcique leur apparaît donc comme *une exotoxine simple*, douée de propriétés différentes coexistant à des degrés variés. C'est ainsi que, par exemple, les conditions de culture pourraient permettre le développement de l'une des propriétés aux dépens des deux autres. Par la suite, Bryce et Burnet (10) ont admis que la substance capable de causer chez l'homme la nécrose lorsqu'on l'injecte par voie intra-dermique, diffère de l'hémolysine active sur les globules de lapin.

Contrairement à Burnet, Gross (11) constate que *les propriétés hémolytiques* apparaissent d'abord, généralement dans les cultures de 1 à 6 jours, et *les propriétés nécrotiques* plus tardivement, dans les cultures de 8 à 14 jours. Cependant, tous les filtrats nécrosants étant en même temps hémolytiques, Gross croit qu'il s'agit d'une même propriété. Pour lui, *hémolysine*, *leucocidine*, *dermotoxine*, *toxine léthale* ne sont qu'une même substance contenue dans le filtrat.

Pour Parker, Weld et Gunther (12) le traitement de 2 cc de filtrat par 1 cc de stroma globulaire permettrait la fixation de *la leucocidine et de l'hémolysine*, mais non celle de la *nécrotoxine*. D'autre part, les filtrats provenant de souches différentes ne contiendraient pas les mêmes quantités *d'hémolysine*, *de nécrotine et de toxine léthale*. On pourrait rencontrer des toxines d'un pouvoir nécrosant, mais sans effet par voie intraveineuse; d'autres, fortement hémolytiques n'auraient aucune action sur la peau. Les auteurs concluent que le pouvoir dermo-nécrotique est différent des pouvoirs toxique, hémolytique et leucocidique.

D'après les constatations de Burky (13) la toxine léthale apparaît plus rapidement que l'hémolysine et se montre plus stable, résistant mieux, en particulier, au vieillissement. Cet auteur note que la perte du pouvoir hémolytique peut être associée avec une augmentation de la toxicité. Certaines souches donnent plus de toxine léthale que de toxine hémolytique, alors que pour d'autres le contraire se produit. Burky cite le cas d'une toxine non hémolytique qui tuait le lapin à la dose de 1 cc par kilogramme de poids. Il indique d'autre part qu'une toxine mortelle pour le lapin, mais privée de pouvoir hémolytique et nécrotique, développe, lorsqu'on l'injecte à l'homme, des anticorps capables de neutraliser le facteur léthal, mais qu'elle n'augmente pas le taux des anticorps naturels antihémolytiques et antinécrotiques. L'auteur conclut que le pouvoir lytique est indépendant du pouvoir léthal.

Parish et Clark (14) croient à l'existence d'une seule toxine à actions multiples.

Panton et Valentine (15) croient à l'identité de l'hémolysine pour les globules de lapin, de la nécrotine et de la toxine léthale, mais ils pensent que l'hémolysine qui agit sur les globules humains diffère de celle qui attaque les globules de lapin. Leur opinion est basée sur le fait que les globules humains se montrent incapables d'épuiser un filtrat staphylococcique de son pouvoir hémolytique pour les globules de lapin. A ce propos Gengou fait justement remarquer que ce n'est pas là une preuve en faveur de la pluralité des hémolysines, car la lyse « in vitro » des hématies humaines par les filtrats staphylococciques est beaucoup moins aisée que celle des hématies de lapin, infiniment plus sensibles à l'hémolysine. Il montre que l'affinité de la toxine pour les hématies humaines est faible comparativement à son affinité pour les hématies de lapin. C'est pourquoi, lorsqu'on traite du filtrat par les premières, celui-ci peut encore contenir suffisamment d'hémolysine pour dissoudre les hématies de lapin, celles-ci, très avides, épuisent le liquide de toute action sur les globules humains et les globules de cobayes, peu sensibles.

Panton et Valentine ont admis d'autre part que la substance qui hémolyse les globules de lapin et détermine dans le derme de ceux-ci la formation d'une escarre diffère de la substance agissant sur les leucocytes humains.

Se basant sur le fait que 1 cc de toxine mise en contact pendant 3 heures au laboratoire avec 10 cc de globules perd ses propriétés hémolytiques et dermonécrotiques, Nelis conclut à l'unicité de la toxine. Il explique le fait qu'*une toxine non hémolytique* peut encore se montrer mortelle pour le lapin, par la présence d'*une paratoxine*. Ramon et Richou pensent que ce fait peut s'expliquer par l'hypersensibilité acquise des animaux, sans qu'il soit nécessaire de faire intervenir une hypothétique « *paratoxine* ».

Stookey (16) constate que le pouvoir dermonécrotique des filtrats disparaît habituellement avant le pouvoir hémolytique. Il trouve des *Staphylocoques hémolytiques, d'autres dermonécrotiques, d'autres encore possédant* les deux propriétés et apporte ainsi des arguments en faveur de la non-unicité.

Pour Fossmann (17) la dermotoxine est peut-être identique à la toxine léthale, mais non à l'hémolysine. Ses affirmations sont basées sur les constatations suivantes : Certains filtrats riches en hémolysine n'auraient pas de pouvoir toxique : des souches très virulentes n'auraient pas de pouvoir hémolytique ; un sérum préparé par lui a neutralisé le pouvoir dermotoxique, mais non le pouvoir hémolytique : certains sérums pauvres en antihémolysine sont cependant capables de protéger contre l'intoxication staphylococcique.

Lewine (18) a titré 10 sérums par trois méthodes différentes et constate ainsi un parallélisme parfait. D'autre part, utilisant la technique d'adsorption sélective de Weld et Gunther par les globules rouges de

lapin, il trouve que les trois propriétés appartiennent *à une même molécule de toxine.*

Timmermann (19), en soumettant un filtrat staphylococcique à l'action du formol, a constaté que les propriétés léthales et nécrotiques sont plus rapidement attaquées que le pouvoir hémolytique. Il en conclut que le pouvoir hémolytique est différent du pouvoir nécrotique et léthal. Il n'a pu déterminer si l'activité léthale et dermonécrotique relève d'un ou de plusieurs facteurs distincts.

Gengou (20) pense que les diverses propriétés de la toxine staphylococcique ne sont pas distinctes. Certains de ses arguments sont de grande valeur. Il note que la toxine produite sur milieu synthétique a les mêmes propriétés que celle obtenue en milieu peptoné et possède les mêmes caractères de thermostabilité. Ces toxines sont neutralisées également par *le même sérum anti-staphylococcique* et l'auteur conclut que ces faits plaident en faveur de l'unicité.

« Si nous réservons — dit Gengou — jusqu'à ce que soient acquises des notions plus précises, la question de savoir par quel mécanisme s'exerce l'action déprimante de filtrats microbiens divers, par exemple *les filtrats staphylococciques*, sur le pouvoir phagocytaire de leucocytes, tels que les globules blancs humains, tout se passe conformément aux constatations que nous avons relatées antérieurement, *comme si les actions cytologiques exercées par ces filtrats* (sur les globules rouges de diverses espèces animales, sur les globules blancs, les hématoblastes, les cellules des capsules surrénales, etc. du lapin), de même que les propriétés toxiques exercées « *in vivo* » par ces filtrats (soit chez la souris par voie intrapéritonéale, soit chez le lapin par voie intraveineuse) ainsi que la nécrose consécutive à l'injection intradermique, *étaient dues à une seule et même substance.* »

« La démonstration de l'épuisement d'un filtrat staphylococcique de ses diverses propriétés par l'action adsorbante d'une espèce cellulaire, par exemple par les hématies de lapin, nous paraît justifier cette conclusion formulée par nous précédemment et à laquelle sont arrivé également plusieurs auteurs. »

L'ensemble des résultats que nous venons d'exposer et les multiples constatations que Richou (21) a pu faire au cours de l'étude de *la toxine staphylococcique* poursuivie depuis 1935, incitent à penser que la toxine hémolytique pour les globules de lapin, leucocidique, dermonécrotique et léthale est « une ».

Nous aurons l'occasion de revenir sur ce problème au cours de nos travaux personnels.

CHAPITRE II

ÉVALUATION DU POUVOIR PATHOGÈNE DES STAPHYLOCOQUES

De multiples méthodes ont été préconisées pour apprécier *le pouvoir pathogène des Staphylocoques*. Nous n'avons pas l'intention d'exposer ici tous les facteurs et propriétés qu'on a essayé d'utiliser à ce sujet. Nous avons déjà mentionné dans notre introduction les quatre épreuves essentielles auxquelles on a habituellement recours à ce sujet :

— épreuve positive par inoculation intradermique au lapin;
— épreuve de l'action coagulante de la bactérie sur le plasma sanguin;
— épreuve du pouvoir fermentatif sur le mannitol;
— réaction au violet cristallisé.

La détermination du pouvoir pathogène sur l'animal pourrait apparaître comme une méthode de choix; on devrait pouvoir évaluer « *in vivo* » sur le lapin, soit le pouvoir pathogène général *du Staphylocoque*, soit son pouvoir pathogène local. La détermination du premier a pour inconvénient de nécessiter un trop grand nombre d'animaux; pour le second, Kourilsky et Mercier ont élaboré en 1940 une méthode permettant d'évaluer facilement, avec un nombre de lapins restreint, *le pouvoir pathogène local du Staphylocoque*. Elle consiste à injecter 1 cc de dilution en soluté physiologique allant de 1/10 à 1/2 000 d'une suspension de culture de 24 heures; on note la dilution qui donne une réaction inflammatoire nette au 4e jour. Pour plus de détails, nous renvoyons aux auteurs (22).

Nous reviendrons sur le pouvoir coagulant de *la toxine staphylococcique* ultérieurement.

Les nombreuses études effectuées sur *les propriétés enzymatiques vis-à-vis des substances ternaires ont montré que la fermentation du mannitol* serait la seule caractéristique du *Staphylocoque pathogène*. La méthode la plus usitée actuellement est celle qui a recours au milieu solide renfermant 75% de chlorure de sodium, 10% de mannitol et une trace de rouge de phénol comme indicateur. Il s'agit du milieu gélosé de Chapman. Kourilsky et Mercier font remarquer « qu'il est nécessaire de noter la fermentation du mannitol dans les 48 premières heures de culture, car passé ce délai, *les Staphylocoques*, même non pathogènes, peuvent fermenter le polyalcool ».

Richou a pu montrer que certaines souches qui ne coagulent pas le plasma oxalaté peuvent fermenter le mannitol en moins de 48 heures et

il conclut qu'il faut lire la réaction au bout de 48 heures au maximum, pour avoir une appréciation assez exacte du pouvoir pathogène.

La réaction du violet cristallisé a été proposée en 1935 par CHAPMAN et BERENS. RICHOU a abandonné depuis longtemps cette méthode, car elle est entachée d'un pourcentage important d'erreur; d'autre part, il faut remarquer qu'un certain nombre de *Staphylocoques* sont particulièrement sensibles à l'action antibactérienne *du violet cristallisé* qui peut empêcher l'amorcement de la culture.

Avant d'envisager *les propriétés enzymatiques des Staphylocoques pathogènes*, nous voudrions encore mentionner *la production de pigment*, prise comme critère de virulence. En effet, pendant longtemps on a cru que seuls *les Staphylocoques dorés et quelques Staphylocoques citrins* étaient pathogènes, alors qu'on considérait *les Staphylocoques blancs* comme inoffensifs. Cependant, un grand nombre d'auteurs a pu établir qu'en réalité le parallélisme entre la production du pigment et l'aptitude pathogène n'est pas rigoureux.

Les propriétés enzymatiques toxigènes des Staphylocoques :

Les Hémolysines :

En 1894, VANDEWELDE a pour la première fois signalé *le pouvoir hémolytique de la toxine staphylococcique.* Depuis, l'on a distingué des hémolysines α, β et δ; deux techniques peuvent être utilisées pour mettre en évidence *les hémolysines staphylococciques* qui peuvent agir soit sur les globules de lapin (*hémolysines* α) soit sur les globules de mouton (*hémolysines* β).

Pour la méthode directe, on utilise habituellement des boîtes de Pétri contenant environ 10 cc de bouillon gélosé à 3% et 0,5 cc de sang de mouton oxalaté à 2‰, le mélange est effectué lorsque la température de la gélose fondue est revenue à environ 50°. On effectue l'ensemencement punctiforme *des Staphylocoques* et on dispose les boîtes à l'étuve à 37° pendant 24 heures puis à la glacière pendant 12 heures.

Les souches produisant uniquement *l'hémolysine* α donnent autour des colonies une zone d'hémolyse complète à contour mal limité, qui ne marque aucun progrès après le séjour de ces cultures à la glacière.

Les souches produisant uniquement *l'hémolysine* β donnent une zone d'hémolyse partielle, à contour bien limité qui s'accentue après séjour à la glacière, comme cela a été démontré par BIGGER *et ses collaborateurs* (23).

Les souches produisant *à la fois l'hémolysine* α et β donnent une zone d'hémolyse complète et mal limitée (*hémolysine* α) entourée d'une ou plusieurs zones d'hémolyse partielle à contour bien délimité (*hémolysine* β).

De nombreux auteurs se contentent de faire l'ensemencement sur la gélose au sang de mouton. D'autres, parmi lesquels KOURILSKY *et ses*

collaborateurs, jugent préférable d'ensemencer la souche à étudier sur deux boîtes de Pétri, contenant l'une de la gélose au sang de mouton, l'autre de la gélose au sang de lapin, ce dernier étant beaucoup plus sensible *à l'hémolysine* α que le sang de mouton.

Les auteurs ne sont d'ailleurs pas d'accord sur la lecture des résultats : si, par exemple Christie, North et Parkin ne considèrent comme hémolytiques que les souches donnant une large zone d'hémolyse, Kourilsky, ainsi que Richou, classent comme hémolytique *tout Staphylocoque* qui détermine une hémolyse perceptible.

D'autre part, il n'y a pas toujours correspondance entre l'importance de l'hémolyse produite sur la gélose au sang et la valeur de *l'hémolysine* obtenue en milieu liquide. Malgré ces quelques imperfections, cette technique simple permet de faire une discrimination rapide entre les souches hémolytiques et les souches non hémolytiques.

La méthode indirecte, plus complexe mais plus précise que la précédente, consiste à ensemencer *le Staphylocoque* à examiner dans un milieu approprié et à rechercher ensuite dans ce substrat la présence ou l'absence *des hémolysines* α et β. En général, *les deux hémolysines* sont produites dans les mêmes conditions; certains auteurs, tels que Mercier et Pillet (24) ainsi que Bryce et Rountree (25) emploient le milieu qui sert habituellement pour la production de *la toxine* α. Kourilsky utilise le milieu de digestion papaïnique de *viande de veau*. D'autres milieux peuvent encore être utilisés, c'est ainsi que le milieu à base de digestion papaïnique *de viande de cheval* a donné de bons résultats à Richou et ses collaborateurs en ce qui concerne la production *d'hémolysines* α et β.

La culture était effectuée pendant 7 jours à 37° sous atmosphère d'air et de CO_2 (20 %); la filtration est faite ensuite sur *bougie Chamberland* L_2 et L_3.

Pour se rendre compte de la valeur exacte de *l'hémolysine* α ainsi obtenue on recherche habituellement la dose minimale hémolytique, c'est-à-dire *la plus petite dose de toxine capable d'hémolyser une goutte d'hématies de lapin lavées trois fois et diluées au* 1/3. Pour cela, on porte dans des tubes à hémolyse et sous forme de dilutions, des quantités décroissantes de *l'hémolysine* α à titrer : par exemple 1 cc des dilutions à 1/10, 1/50, 1/100, etc., on ramène le volume de chaque tube à 2 cc au moyen de soluté physiologique, puis on ajoute dans chacun d'eux une goutte de globules de lapin. On agite, on dispose à l'étuve à 37° pendant une heure en agitant de temps en temps. La lecture de l'hémolyse est effectuée une heure après la sortie de l'étuve et à la température du laboratoire en ne tenant compte que de l'hémolyse totale.

La recherche de la dose minimale hémolytique de la toxine β s'effectue exactement de la même façon, en utilisant non pas des hématies de lapin, *mais des hématies de mouton.*

Toutefois, certains *Staphylocoques*, en particulier ceux d'origine animale, élaborant à la fois les *hémolysines* α et β, il y a lieu d'éliminer

d'abord *la toxine* α qui exerce un certain pouvoir hémolytique sur les globules de mouton. Smith et Bryce (26) ont décrit trois méthodes permettant d'atteindre ce résultat : *l'action du formol* qui détruit plus rapidement *l'hémolysine* α, *la neutralisation de l'hémolysine* α par l'immunsérum anti-α, et *le chauffage* de 30 minutes à 60° qui détruit *la toxine* α, alors que *la toxine* β, plus résistante à la chaleur, conserve une partie importante de son pouvoir hémolytique.

Richou recommande surtout cette dernière méthode. Cependant, certaines toxines conservent un pouvoir hémolytique pour *les hématies de lapin* encore appréciable après ce chauffage de 30 minutes à 60°, peut-être en rapport avec le pH du substrat. Il faut donc s'assurer que le chauffage a bien détruit *l'hémolysine* α en mettant en contact pendant une heure à 37° 1,0, 0,33, 0,10, 0,05 cc du filtrat chauffé avec une goutte de globules de lapin. On pourra également rechercher la dose combinée ou « *dose test-hémolytique* » de Ramon et Richou du filtrat de culture, indice du pouvoir antigène de la toxine, mais seulement dans le cas où la toxine renferme par centimètre cube un nombre important de doses minimales hémolytiques.

La Coagulase :

Les Staphylocoques possèdent la propriété de coaguler le plasma oxalaté, en particulier celui de l'homme et du lapin, propriété qui est considérée comme le meilleur test « *in vitro* » de leur pouvoir pathogène. On peut utiliser indifféremment le plasma humain, le plasma de lapin, celui de bœuf ou de cheval.

Le plasma est préparé de la façon suivante : on prélève 20 cc de sang dans un tube à centrifuger renfermant 0,04 g d'oxalate de potasse ou, plus commodément, 2 cc d'une solution d'oxalate de potasse à 2%. Le mélange est ensuite centrifugé à 8 000 t/m pendant 10 minutes et le plasma recueilli est conservé à la glacière. Malgré cette précaution, il y a intérêt à l'utiliser frais, au moins dans les 4 jours suivant sa préparation, car, à mesure qu'il vieillit, il coagule de plus en plus lentement, de plus en plus difficilement et de plus en plus irrégulièrement. Il paraît indiqué, d'autre part, d'employer de préférence le plasma non pas pur mais dilué au 1/3 au moyen de soluté physiologique. Richou a constaté en effet que la coagulation commence souvent dans le plasma dilué au 1/3 ou au 1/5 pour apparaître ensuite dans ceux employés purs et dilués au 1/10, au 1/20, etc.

Pour la réaction de coagulation, le plasma dilué au 1/3 est réparti dans des tubes à hémolyse à raison de 0,5 cc et additionné de 0,5 cc d'une culture *du Staphylocoque à étudier*. Deux procédés peuvent être utilisés : on peut ajouter au plasma 0,5 cc d'une culture de 24 heures en bouillon. Toutefois, il est extrêmemet important de tenir compte du fait que certains bouillons peuvent coaguler spontanément le plasma oxalaté; il faut donc préparer des tubes témoins, contenant 0,5 cc de plasma et 0,5 cc du bouillon aseptique.

Pour éviter cet inconvénient, Richou et ses collaborateurs préfèrent une seconde méthode qui consiste à ajouter aux tubes contenant 0,5 cc de plasma 0,5 cc d'une suspension *de Staphylocoques* dans le soluté physiologique; celle-ci est préparée à partir d'une culture de 24 heures sur gélose inclinée (10 cc de soluté physiologique par tube de culture).

La réaction a lieu à 37°, on note les résultats toutes les 30 minutes pendant les premières heures pour le cas où le plasma, préalablement coagulé, serait redissous *par la fibrinolysine élaborée par certains Staphylocoques*, ce qui induirait en erreur. La lecture définitive est effectuée après 24 heures de séjour à l'étuve. Si après ce temps la coagulation fait défaut, la réaction est considérée comme négative.

La Fibrinolysine :

On sait que c'est Much (27) qui attira le premier l'attention sur *le pouvoir fibrinolytique des Staphylocoques*. Kleinschmidt (28) arriva, lui aussi, à la conclusion qu'il existait *une fibrinolysine dans certaines cultures de Staphylocoques*. Cette propriété fut également étudiée par Gonzenbach et Uemura (29), Gratia (30), Gengou (31), Van Breuseghem (32), Murray-Fischer (33), etc.

L'action de *la fibrinolysine* qui occasionne la dissolution du plasma oxalaté est plus ou moins rapide, suivant l'espèce de plasma utilisé : avec le plasma de chien, la fibrinolyse se produirait 2 ou 3 heures après la coagulation, le plasma humain serait beaucoup plus long à se coaguler et à se redissoudre (Gratia).

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour mettre en évidence la production *des fibrinolysines par les Staphylocoques*.

Méthode directe :

Kourilsky *et ses collaborateurs* donnent la préférence à la méthode de Christie et Wilson (33ª), plus sensible, disent-ils, que celle de Tillet et Gardner, mais à l'inverse de Christie et Wilson qui se servent *de fibrinogène de mouton*, ils utilisent *le fibrinogène de lapin* qui leur paraît beaucoup plus sensible. Ils recommandent la technique suivante :

Le plasma oxalaté à 2% est chauffé à 56° au bain-marie pendant 10 minutes; la fibrine précipitée est recueillie par centrifugation et reprise par le soluté physiologique en quantité égale à celle du plasma primitif. On dépose 1 cc de cette suspension dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre dans laquelle on coule ensuite 6 cc de gélose à 3% ramenée à 50°. On mélange assez rapidement et on laisse solidifier. Les souches à étudier sont ensemencées en 4 à 5 points déterminés de la surface; sur cette boîte de gélose opacifiée par la fibrine, la lecture se fait facilement après 12 heures de séjour à l'étuve à 37°. Dans les cas positifs, on observe une auréole transparente due à la lyse de la fibrine tranchant sur le fond opaque de la boîte.

Méthode indirecte :

La fibrine préparée comme précédemment est diluée au 1/10 par le soluté physiologique et répartie dans une série de tubes à raison de 1 cc. On porte alors dans ces tubes des quantités variables de filtrat de culture *de Staphylocoque* en expérience : 1 - 0.5 - 0.3 - 0.2 - 0.15 - 0.1 cc. etc. Après avoir fermé les tubes à l'aide d'un bouchon de caoutchouc et bien mélangé, on les porte à l'étuve à 45° pendant 24 heures. A la sortie de l'étuve on constate que certains mélanges dans lesquels la fibrine a été lysée sont devenus parfaitement limpides, alors que ceux dans lesquels la réaction est négative restent troubles.

Lorsque 1 cc *de filtrat de culture lyse la fibrine contenue dans* 1 cc *de suspension*, Richou *donne à ce filtrat le titre de* 1 *Unité fibrinolytique*. Ce titre sera de 3 unités si la lyse est obtenue avec 0.33 cc de filtrat, de 10 unités si elle est obtenue avec 0,1 cc, etc.

Cette méthode a permis à Richou et à ses collaborateurs de mettre en évidence dans quelques filtrats le principe fibrinolytique, mais en faible quantité seulement.

Que l'on utilise la méthode directe ou la méthode indirecte pour rechercher *des souches de Staphylocoques fibrinolytiques, il semble bien que toutes les souches pathogènes ne soient pas fibrinolytiques*. En particulier, les souches d'origine animale ne produisent pas ou seulement dans un faible pourcentage de cas *la fibrinolysine*. Si la production peut servir dans une certaine mesure à différencier *les Staphylocoques pathogènes* des microbes non pathogènes lorsqu'ils proviennent de lésions humaines, elle ne peut être utilisée pour la discrimination *des Staphylocoques d'origine animale*. Eckner a essayé, *dans le Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, de préparer une fibrinolysine staphylococcique purifiée en ajustant le centrifugat d'un bouillon de culture à pH = 2.8 à 3.1 au moyen d'acide lactique à 10 %. Comme réactif de précipitation, il introduit la double dose d'un mélange d'acétone et d'éthanol à parties égales. Il se forme un précipité : on centrifuge, on décante et on reprend le culot dans 30 cc de solution de lactate de calcium à 2 % ajusté à pH = 4.0. Pour le dosage de *cette fibrinolysine* il emploie parallèlement la technique de Tillet et Gardner (34) au moyen de plasma oxalaté coagulé par recalcification et une technique modifiée utilisant un système de coagulation artificiel, constitué par *une solution de fibrinogène* à 0.6 % *et une solution de thrombine* à environ 2 unités. Il utilise *le fibrinogène de bœuf Sigma* qui est hautement purifié et possède des propriétés coagulantes constantes. *La thrombine est fournie par la Thrombase Roussel* (10 mg 5 cc). Il teste les solutions culturales à la dose de 0.5 - 0.2 - 0.1 - 0.05 cc. En procédant de cette façon, il obtient la coagulation de tout le substrat réactionnel après 5 minutes et la lyse commence à se manifester après 10 minutes dans les tubes *à concentration de fibrinolysine maximale*. L'auteur conclut que *les Staphylocoques dorés virulents d'origine humaine* sont producteurs de fibrinolysine dans 80 % des cas, *les souches humaines non pathogènes* sont *fibrinolytiques* dans

10% des cas. Ceci confirme les constatations de Pillet *et ses collaborateurs* (35) qui ont comparé *la valeur du test de fibrinolysine avec celle du test de la coagulase* et trouvent les résultats comparables d'emblée. Ce qui conduit à penser que *la propriété de fibrinolyser le plasma, comme celle de le coaguler, vont de pair et sont toutes deux caractéristiques des Staphylocoques pathogènes.*

On se rend ainsi compte de l'importance de cette épreuve.

La Gélatinolysine :

On sait depuis longtemps que certaines souches *de Staphylocoques sécrètent une protéinase qui liquéfie la gélatine.* Deux techniques peuvent être utilisées pour mettre en évidence *cette gélatinolysine.*

Méthode directe:

Il suffit d'ensemencer *le Staphylocoque* en milieu gélatiné. A partir du 2e au 10e jour, on note une liquéfaction en forme d'entonnoir d'importance variable. Environ 80% *des Staphylocoques dorés*, 50% *des Staphylocoques blancs* et *beaucoup de Staphylocoques citrins* possèdent cette propriété qui peut disparaître à la longue. Saski et Feygin (36) indiquent qu'il n'y a pas de concordance entière entre *le pouvoir protéolytique des Staphylocoques*, en particulier celui de liquéfier la gélatine et leur pouvoir toxigène. Ainsi, *des Staphylocoques* sans action sur la gélatine n'en peuvent pas moins être toxigènes. Selon Daranyi (37) il n'y aurait pas non plus de parallélisme entre la propriété gélatinolytique et le pouvoir pathogène.

Méthode indirecte :

Étant donné l'importance du rôle joué actuellement par *les Staphylocoques en pathologie humaine et animale*, il a semblé intéressant à Richou de reprendre l'étude de *cette gélatinolysine.* Il a tout d'abord cherché à mettre au point une méthode permettant d'évaluer quantitativement l'enzyme gélatinolytique. La technique utilisée est calquée sur celle qui a permis à l'auteur d'étudier *les propriétés gélatinolytiques des filtrats de culture du Bacille tétanique et du Bacille subtilis* [Ramon, Richou et P. Ramon (38)], *du Penicillium notatum et de l'Actinomyces griseus* [Richou, Gerbeaux et Schlaepfer (39)].

Dans une série de tubes contenant 1 cc d'une solution de gélatine à 3% préalablement stérilisée et refroidie à la température de 45°, on ajoute des quantités variables de toxine staphylococcique : 1 - 0,5 - 0,3 - 0,2 - 0,15 - 0, 1 cc, etc. On prépare également une série de tubes témoins en ajoutant à la gélatine des quantités variables du bouillon ayant servi à la préparation de la toxine. Après avoir bien mélangé, on abandonne les tubes à 45° pendant 24 heures, puis on les porte à la glacière à +3°. Au bout de quelques heures on note quelle est la plus petite quantité de filtrat qui a provoqué dans ces conditions la gélatinolyse. *Si c'est, par exemple*, 0,1 cc, on dira que le filtrat est actif, pour

ce qui est de son pouvoir gélatinolytique. au 1/10 ou, par convention, *qu'il renferme 10 unités gélatinolytiques par centimètre cube.*

Cette méthode permet ainsi *de chiffrer la valeur gélatinolytique* d'un filtrat et, par suite, de comparer entre elles les valeurs des différents filtrats qui, avec les souches que Richou a utilisées, variaient de 1 à 30 unités.

En ce qui concerne les rapports entre le pouvoir gélatinolytique et les autres propriétés des filtrats de culture *de Staphylocoques*, Richou *et ses collaborateurs* ont constaté que certaines souches de Staphylocoques d'origine humaine ou isolées de la mamelle de la vache, élaborant *des hémolysines* α et β très actives, sécrètent aussi *une enzyme à pouvoir gélatinolytique prononcé*. D'autres souches, au contraire, ne produisent dans les mêmes conditions que des faibles quantités de *gélatinolysine*. D'autres, enfin, très faiblement toxigènes élaborent des quantités notables *d'enzymes gélatinolytiques*. Il semble donc que l'on ne puisse établir un rapport *entre le pouvoir toxigène des Staphylocoques et la production des gélatinolysines* et que, par suite, le pouvoir hémolytique et le pouvoir gélatinolytique appartiennent à des principes différents. De même il n'y a aucun rapport entre *le pouvoir pathogène des Staphylocoques*, déterminé par le test de la coagulation du plasma oxalaté, de la fermentation du mannitol et le pouvoir gélatinolytique des filtrats. Il est cependant intéressant de relever, dans le cadre de notre travail, l'existence de cette enzyme.

Lipases staphylococciques :

En 1939, Richou (40) *et ses collaborateurs* ont décelé par une méthode de diffusion en gélose, la présence dans les filtrats de culture de certains Staphylocoques d'*une lipase active* sur une graisse neutre (huile de maïs) et sur les ovo-lipides (jaune d'œuf). Ce pouvoir lipolytique de certains Staphylocoques a été déjà mis en évidence en 1939 et 1941 par l'école italienne de Bruni, Pernice et leurs collaborateurs (40).

Poursuivant leurs essais, ces auteurs ont recherché si cette lipase est douée *de propriétés antigéniques* et entraîne par conséquent dans l'organisme traité l'apparition *d'une anti-enzyme spécifique* capable de neutraliser son pouvoir lipasique. *L'antilipase sérique* a été titrée par la méthode suivante : la Gélose de Mac Lund modifiée par Kolmer, sans peptone ni glucose, chauffée puis ramenée à 55°, est additionnée soit de jaune d'œuf, soit d'huile de maïs et de bleu de Nil comme indicateur. Elle est ensuite répartie à raison de 20 cc par boîte de Pétri. On pratique dans la gélose des cupules de 8 mm de diamètre dans lesquelles on dépose 1/20 de cc des mélanges restés en contact pendant 1 heure à la température du laboratoire et préparés de la façon suivante :

1 cc d'une dilution *de toxine staphylococcique* douée d'une activité de 10 unités vis-à-vis du jaune d'œuf et de l'huile de maïs est additionné de 1 cc de sérum pur, puis dilué à 1/3 - 1/10 - 1/30 - 1/50 - 1/100, etc.

Si, par exemple, le sérum dilué au 1/3 ou au 1/10 empêche l'apparition d'une zone d'éclaircissement, alors qu'il ne l'empêche pas lorsqu'il

est dilué à 1/30 - 1/50, etc., les auteurs admettent que l'activité de ce sérum est comprise entre 10 et 30 unités antilipasiques. Au cours de ces expériences, les auteurs ont constaté que *les anatoxines staphylococciques* utilisées possèdent un pouvoir lipasique vis-à-vis du jaune d'œuf et de l'huile de maïs et se montrent d'autre part capables de faire apparaître dans le sérum de lapins *une antilipase* annihilant spécifiquement l'action *des toxines staphylococciques* sur les deux lipides employés. Grâce à leur méthode de diffusion en gélose, Richou *et ses collaborateurs* ont ainsi pu démontrer que *certains Staphylocoques* sont capables d'élaborer des lipases à pouvoir antigénique spécifique.

Kroehne (41) a examiné un certain nombre de *toxines staphylococciques* mises à sa disposition par Richou. Il a pu remarquer que des doses trop fortes de jaune d'œuf agissent comme des réactifs tampon très actifs, de sorte qu'il a eu recours à une émulsion à 0,4% de jaune d'œuf, c'est-à-dire 10 fois plus faible que la dose préconisée par Richou. L'auteur n'a pas pu déceler *le pouvoir lipolytique ou estérasique dans la toxine staphylococcique des souches Wood:* par contre, il note une action *lipasique certaine des toxines des Staphylocoques Bouley et Hautefort.* Les deux toxines étaient cependant dépourvues d'*estérases.* Par contre, *une toxine de Staphylocoque* N° 2185 *dégradait l'huile d'olive* avec une rapidité et une intensité qui correspondait sensiblement à celle de 100 mg *de poudre lipasique de Mycobacterium phlei.* La comparaison entre le pouvoir lipolytique de cette dernière et celui de *la toxine staphylococcique sur le jaune d'œuf* a permis à Kroehne de constater que cette dernière est plus faible, ce qui prouve que *la toxine staphylococcique* contient un taux de lipases actives sur les esters d'acides gras élevés beaucoup plus important que *de lécithinase.*

D'après ces travaux, il semble donc qu'il s'agisse essentiellement *de lipases proprement dites* élaborées par certains Staphylocoques.

La Caséinase :

Pour la mise en évidence de *cette enzyme,* nous avons suivi la technique de Richou (42) : on prépare *une suspension de caséine* (caséine d'après Hammarstein) renfermant 2 g de caséine pour 20 cc d'eau distillée, qui est portée pendant 10 minutes à 70°. On incorpore à 100 cc du milieu de base 10 cc de cette suspension à 1/150, contenant une trace de tournesol comme indicateur. Le milieu de base est toujours la gélose de Mac Lund modifiée par Kolmer.

Le milieu ainsi obtenu est réparti à raison de 20 cc dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre. On pratique ensuite, dans la gélose solidifiée, des cupules de 8 mm de diamètre à l'aide d'un emporte-pièce. On dépose dans ces cupules 0,05 cc de toxine pure, puis diluée à 1/3 - 1/10 - 1/30, etc. Les boîtes de Pétri sont placées pendant 24 heures à l'étuve à 45°, température optimale pour l'enzyme. On fait alors la lecture des réactions qui, lorsqu'elles sont positives, se traduisent *par le virage* de l'indicateur coloré, *un halo* d'éclaircissement ou *une zone de précipitation* autour des cupules.

La Lécithinase :

Pour contrôler la présence de *la lécithinase*, on met 1 mg de lécithine pure en suspension dans 10 cc d'eau distillée. Cette suspension est incorporée à 100 cc du milieu de base. Pour plus de détails concernant cette enzyme staphylococcique nous renvoyons aux travaux précités de Bruni, Richou et Kroehne, ayant trait au pouvoir lipolytique de ces germes.

Nous avons tenu à donner cet exposé sur *les différentes enzymes élaborées par les Staphylocoques* pour faire ressortir que *la toxine staphylococcique* doit renfermer un nombre d'antigènes polyvalents, fait qui renforce la thèse de la pluralité des toxines.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE III

ANALYSE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE EN MILIEU GÉLOSÉ

Le principe de *l'analyse immuno-électrophorétique* a été établi en 1953 par Grabar et Williams (43) et les détails techniques ont été décrits en 1955. Depuis lors quelques améliorations et modifications mineures ont été apportées à cette technique, comme J. Courcon et J. Uriel (44) l'ont mentionné. Nous décrivons ci-dessous la méthode telle qu'elle a été élaborée par ces auteurs pour l'analyse des sérums humains normaux et pathologiques. Pour l'immuno-électrophorèse il faut envisager :

— la préparation de la gélose,
— la préparation des plaques,
— la préparation des immunsérums,
— l'appareillage,
— l'électrophorèse et la révélation immuno-chimique,
— les colorations.

Purification de la gélose :

Courcon et Uriel emploient de la gélose commerciale de bonne qualité qu'ils introduisent à raison de 30 g dans 400 cc d'eau distillée neutre. On utilise de préférence des bacs de verre et on chauffe le tout au bain-marie. Aussitôt que la gélose est fondue, on la coule dans un récipient plat. Il faut éviter un chauffage trop prolongé qui risque d'hydrolyser la gélose, qui perd ainsi son pouvoir gélifiant. Après gélification, on la coupe en petits dés et on la lave pendant 3 jours avec de l'eau distillée neutre que l'on change deux fois par jour. La gélose est alors égouttée et fondue à nouveau au bain-marie, puis conservée au frigidaire. Comme elle absorbe de l'eau au cours du lavage, il faut prendre le poids sec au départ pour déterminer sa concentration avant de l'utiliser.

Comme le fait remarquer G. Ritschel-Beurlin, on a avantage à préparer une certaine quantité de gélose d'avance, afin d'éviter des variations de ses propriétés d'une préparation à l'autre. On a intérêt à partir d'une gélose déjà purifiée, c'est pour cette raison que nous avons employé le *Bacto Agar Difco*. On dissout 60 g de ce produit dans 1 000 cc d'eau distillée que l'on introduit dans des boîtes de Roux. Pour éviter une trop grande évaporation, nous avons bouché les boîtes de Roux par un bouchon de caoutchouc traversé d'un tube de verre. On liquéfie alors au bain-marie et on transvase dans un grand cristallisoir. On laisse solidifier et on découpe en cubes que l'on soumet à un lavage prolongé pendant 15 jours en changeant l'eau distillée matin et soir. On laisse égoutter les tubes sur papier filtre. Nous avons déterminé le poids sec sur un échantillon de 20 g que nous plaçons à l'étuve à 37° jusqu'à évaporation à poids constant. On ajuste alors le taux de gélose à 3 % au moyen d'eau distillée, puis à 1,5 % à l'aide d'une solution tampon au Véronal de pH = 8,2 et à force ionique de 0,05 :

Véronal sodique ..... 47,586 g

Eau distillée ..... 3 000,00 cc

On dissout, puis on ajoute :

Acide chlorhydrique N/10 ..... 690,00 cc

On ajuste le pH à 8,2 et on introduit encore :

Eau distillée q. s. p. ..... 4 265,00 cc

La solution de gélose ainsi préparée est filtrée sous vide sur un *entonnoir de Büchner* muni de deux couches de papier-filtre. Pour éviter l'hydrolyse de la gélose par des chauffages répétés, nous répartissons dans de petits ballons que nous fermons hermétiquement par un capuchon de cellophane et nous conservons à la glacière.

Pour l'emploi, nous dissolvons au bain-marie le contenu du ballon et coulons la gélose sur les plaques de verre. Dans la pratique courante, on préconise l'introduction d'une solution de *Merthiolate* à la concentration finale de 1/10 000 pour garantir l'asepsie du gel. Ritschel-Beurlin a pu constater que *cet antiseptique présente des inconvénients dans la recherche des précipitines antipoliomyélitiques*, où le *Merthiolate* semble agir comme inhibiteur; nous avons donc renoncé à l'employer.

Préparation des plaques :

Courcon et Uriel emploient des plaques de verre photographique qui doivent être soigneusement lavées pour y étaler ensuite quelques gouttes de gélose à 1 % et que l'on sèche à l'étuve entre 80° et 90°. Cette opération permet à la gélose tamponnée de mieux adhérer à la plaque. D'après les auteurs, on peut employer des plaques de photographie de 13 × 18 cm ou de 18 × 24 cm pour une électrophorèse d'une durée

moyenne de 4 heures 30 minutes ou des plaques de 9 × 12 cm pour une électrophorèse de 90 minutes, ou encore, suivant la microméthode de Scheidegger (45), des lames de préparations microscopiques pour une durée de 35 à 40 minutes.

Nous avons utilisé des plaques de verre de 6,5 × 18 cm couramment employées dans *le colorimètre d'électrophorèse sur papier.*

Préparation des immunsérums :

Courcon et Uriel donnent les indications générales suivantes : *La préparation des immunsérums* présente toujours quelques difficultés. Le nombre et la quantité d'anticorps précipitants formés chez les animaux immunisés avec un mélange complexe d'antigènes dépend *de nombreux facteurs*, dont les plus importants sont :

— l'espèce de l'animal fournisseur de l'immunsérum ;

— la quantité d'antigène injectée ;

— la forme sous laquelle l'antigène est injecté (en soluté physiologique ou avec des adjuvants tels que mélange de Freund ou adsorption sur Alumine) ;

— la voie d'injection (intraveineuse, intramusculaire, intrapéritonéale) ;

— la périodicité des injections.

Il est recommandé d'utiliser simultanément deux méthodes d'immunisation, par exemple de faire suivre une immunisation par la méthode de Freund d'une série d'injections intraveineuses de l'antigène dilué dans le soluté physiologique [Kabat et Mayer (46)].

Comme antigène nous avons employé *une polytoxine préparée avec différentes toxines staphylococciques* gracieusement mises à notre disposition par Richou. Nous aurons l'occasion d'y revenir. Nous avons utilisé des lapins mâles, jeunes, de même origine, pesant de 3 000 à 4 000 g ; nous leur avons injecté 0,5 cc de polytoxine *par voie sous-cutanée* au niveau de l'abdomen, à raison de 2 injections à quatre jours d'intervalle. Dans ces conditions il se forme facilement *des dermonécroses*, c'est pourquoi nous avons interrompu la vaccination à ce stade pendant trois semaines et avons renoncé à *l'emploi d'adjuvants*, la réaction inflammatoire par la toxine étant suffisamment prononcée. On pratique alors une nouvelle injection de toxine par *voie intramusculaire* au niveau de la cuisse. La dose injectée est de 1 cc renouvelée 5 jours plus tard ; les trois semaines suivantes, nous injectons encore 0,5 cc deux fois dans la première semaine et en doublant la dose chaque semaine. Douze jours après la dernière injection, nous avons effectué les premiers prélèvements de sang dans la veine marginale de l'oreille. Le sang est laissé au repos pendant deux heures, afin de rendre plus facile la rétraction du caillot, puis on centrifuge pendant 10 minutes à 2 000 t m ; on décante soigneusement et on centrifuge à nouveau pour obtenir

l'immunsérum qui doit être limpide et dépourvu de toute trace de globules.

Pour procéder *à l'immuno-électrophorèse et à la mise en évidence des précipitines*, on a intérêt à inactiver le sérum pendant 30 minutes à 56°.

L'appareillage :

Pour l'immuno-électrophorèse proprement dite, nous avons également modifié la technique de Courcon et Uriel, puisque nous avons eu recours à *l'appareil Polyphor de la Maison* Chaix *de Nancy*. On dépose quelques gouttes de gélose liquéfiée sur les plaques de verre, on étale sur toute la surface en couche très mince, puis on introduit les plaques sur le support horizontal prévu dans la cuve de l'appareil. Le plateau d'électrophorèse est muni de plaques d'arrêt latérales en plexiglas amovibles maintenues par des cales, réalisant de chaque côté du plateau une tranchée dans laquelle la gélose solidifiée formera une connexion parfaite avec le tampon. La solidification du gel sur les plaques de verre est notablement accélérée par le système de refroidissement de l'appareil. Des réservoirs de dépôt pour le mélange à séparer peuvent être faits à l'emporte-pièce ou par de petits moules en plexiglas de taille variable, coulissant dans des rainures d'une règle-support. L'enceinte d'électrophorèse étant close et saturée, l'évaporation est très réduite, ce qui évite la fissuration du gel, surtout par temps chaud.

Des plaques de verre d'autre dimension peuvent également être employées sans difficulté. Il suffit de délimiter leur aire par deux règles latérales mobiles complétées par 4 cales intercalées dans les tranchées. En augmentant ainsi le nombre des règles et des cales, il devient possible de couler plusieurs bandes de gélose indépendantes pour lesquelles on pourra arrêter l'électrophorèse à des temps différents. Pour les autres détails de manipulation de l'appareil, nous renvoyons à la notice du constructeur.

Notre cuve Polyphor est alimentée par un courant électrique stabilisé grâce à un régulateur de tension permettant de travailler avec des courants allant de 0 à 400 V et jusqu'à 500 mA *(appareil redresseur-transformateur P. Fontaine, Montrouge)*. Ce dispositif est nécessaire pour régler l'intensité du courant suivant le gel de gélose et la solution tampon employés. Avec les réactifs que nous avons utilisés, un potentiel de 3 à 4 V/cm permet d'obtenir un transport des protéines suffisant en quatre heures. Dans ces conditions, on a de 40 à 50 mA par plaque de gélose de 18 cm de long suivant l'épaisseur du gel et la solution tampon utilisée. Notons qu'avec un ampérage plus élevé, l'effet thermique devient gênant.

Le choix des solutions tampon est conditionné par le pH auquel on veut effectuer l'électrophorèse. Leur concentration doit être suffisante pour assurer la constance du pH et pas trop élevée afin d'éviter les effets thermiques du courant employé, pouvant engendrer une évapo-

ration, donc des modifications des concentrations à l'intérieur du gel et parfois sa fissuration.

L'alimentation en tampon s'effectue à l'aide d'un récipient de 5 à 10 litres avec tubulure inférieure, qui se trouve en position surélevée par rapport à la cuve. A la tubulure inférieure, nous avons adapté un bouchon de caoutchouc perforé, muni d'une tubulure de verre en Y, dont les deux branches sont munies de robinets; elles sont reliées par deux tubes de caoutchouc aux ajutages d'entrée des bacs à tampon de la cuve. Le débit goutte-à-goutte se règle par les robinets intercalés sur les tuyaux de caoutchouc. Il est recommandé de réaliser plusieurs fois un contrôle pendant l'électrophorèse et de filtrer de temps à autre le tampon recueilli dans un flacon posé sur le sol. Ceci évite l'obstruction des tubes. Le tampon s'écoule par des tubes de trop-plein. Il faut remarquer que les extrémités des tuyaux ne doivent jamais plonger dans le tampon, car il en résulterait un circuit électrique secondaire.

Le refroidissement du plateau d'électrophorèse et de l'enceinte est obtenu par une circulation d'eau prévue dans le compartiment central de la cuve. Cette circulation se réalise en branchant la tubulure d'entrée sur la canalisation et en réglant un débit modéré; la tubulure de sortie se déverse dans un évier. Il faut éviter la formation d'un matelas d'air qui peut apparaître contre le plafond du compartiment central, surtout au début de l'expérience. Il faut donc maintenir la cuve inclinée pour permettre l'évacuation de l'air résiduel.

L'électrophorèse et la révélation immuno-chimique :

Le principe de *l'immuno-électrophorèse* est basé sur le fait de travailler avec une différence de potentiel aussi élevée que possible sans provoquer trop d'échauffement, et à une concentration en solution tampon suffisante pour éviter des modifications du pH.

L'électrophorèse est effectuée à la température du laboratoire, le voltage est d'environ 5 V/cc dans le gel. Le courant total est de 40 à 50 mA pour les plaques que nous avons utilisées. En principe, nous avons disposé *les immunsérums dans le godet central de la plaque gélosée;* ils étaient dilués de la façon suivante :

Sérum à examiner	0,2 cc
Eau distillée	0,3 cc
Gélose ordinaire non tamponnée à 3% liquéfiée	0,5 cc

On introduit 0,2 cc de ce mélange encore liquide dans le godet au moyen d'une pipette, on laisse solidifier et on recouvre de gélose à 1,5% tamponnée pour égaliser la surface. La solution tampon au Véronal employée dans les cuves est de pH = 8,2 et de force ionique 0,05. Cette faible concentration permet d'éviter un échauffement trop prononcé de la plaque qui aurait pour conséquence une dessiccation de la

gélose. *La durée de l'électrophorèse*, conditionnée par la longueur de la plaque et par la vitesse de migration des protéines, est de 4 à 5 heures dans nos conditions expérimentales. On interrompt alors le courant et l'on procède à la fixation et à la coloration du diagramme électrophorétique.

La fixation a pour but d'immobiliser dans le gel les constituants séparés par l'électrophorèse. Pour cela, nous retirons les plaques de verre de *l'appareil Polyphor*, nous découpons les excès de gélose adhérents au bord et trempons les plaques dans *un bain fixateur* pendant une heure. A ce sujet, nous avons utilisé avec succès une solution à 2% *d'acide acétique cristallisable*. L'expérience nous a montré que la fixation est effective après une heure, mais un séjour plus prononcé dans le bain fixateur ne nuit pas.

Nous procédons ensuite à la dessiccation, selon les indications de Uriel et Grabar (47). Sur les plaques de gélose retirées du bain fixateur nous appliquons une bande de papier filtre et la dessiccation se fait à l'étuve à 37° ou sous un courant d'air provoqué par un ventilateur. L'avantage de cette opération réside dans le fait que *le papier filtre*, en laissant toujours humide la surface du gel, permet une dessiccation graduelle et régulière, évitant ainsi les craquelures qui apparaissent souvent lorsqu'on laisse les plaques de gélose se dessécher à l'air. De plus, le papier filtre absorbe l'excès de sel qui imbibe encore le gel et qui risquerait de cristalliser.

Quand la dessiccation est terminée, on enlève le papier filtre sous le jet du robinet d'eau pour éviter de déchirer la gélose et on nettoie la surface de celle-ci. La couche de gélose primitivement épaisse de 3 à 4 mm, est réduite à une mince feuille collée à la plaque de verre qui lui sert de support.

Coloration et décoloration :

Après avoir laissé sécher complètement les plaques à la température ambiante, on procède à la coloration. Nous avons employé de préférence *le colorant à l'Amidoschwarz :*

Colorant des protéines :

Tampon acétate	900,0 cc
Glycérine	100,0 cc
Amidoschwarz	1,0 g

Bain décolorant :

Eau distillée neutre	830,0 cc
Acide acétique	20,0 cc
Glycérine	150,0 cc

Le tampon à l'acétate est de formule :

Acide acétique N (60 g° /oo) ..... 500,0 cc

Acétate de sodium N /10 (13,6 g° /oo) 500,0 cc

La durée de coloration est de 4 heures, après quoi on décolore dans *la solution décolorante*. Habituellement deux bains successifs d'une heure suffisent pour décolorer complètement le fond de gélose. Cependant, on peut poursuivre cette décoloration pendant une ou deux heures encore sans inconvénient.

Les plaques sont ensuite séchées à l'étuve à 37° ou sous un courant d'air à la température ambiante. D'après Uriel et Grabar, on doit pouvoir décoller ensuite la feuille de gélose de son support de verre et ceci grâce à la proportion de glycérine introduite dans le réactif, qui donne à la plaque de gélose une consistance suffisante et permet également sa conservation indéfinie.

Nous nous sommes cependant rendu compte que ce décollement était assez ardu, et *nous avons préféré conserver nos diagrammes sur les plaques de verre.*

Nous avons ainsi pu contrôler la migration des fractions protéiniques dans le gel au moyen de *sérum de lapin normal* et, ayant constaté la bonne marche de l'analyse, nous avons ensuite appliqué *cette technique à l'immuno-électrophorèse de nos antisérums.*

Immuno-électrophorèse en présence d'antigène staphylococcique :

A ce sujet, nous avons déposé dans la gélose encore liquide deux baguettes de verre parallèlement à l'axe de migration électrophorétique et à une distance convenable et constante du godet central. Lorsqu'on enlève ces baguettes, leur empreinte forme une cuvette régulière. La migration des protéines terminée, on coupe le courant, on retire soigneusement les baguettes de verre pour introduire dans les rainures ainsi obtenues l'*antigène à examiner*. On réalise ainsi la diffusion des deux réactifs immunologiques dans le gel et la zone de précipitation se forme au niveau de leur contact *s'il s'agit d'un système d'antigène-anticorps spécifiques.*

Les quantités d'immunsérum à employer doivent être choisies en fonction des doses d'antigène à examiner, de manière à avoir des proportions aussi voisines que possible *dans la zone d'équivalence de la réaction de précipitation spécifique*. Ce fait est particulièrement important, comme Grabar *et ses collaborateurs* ont pu le monter, puisqu'on n'obtient des précipités avec les antigènes complets que dans une zone restreinte d'équilibre antigène-anticorps.

Pour faciliter *l'immuno-électrophorèse*, on a intérêt à avoir recours préalablement à *la technique sur plaques en boîte de Pétri*, d'exécution plus simple et permettant de déterminer *les dilutions respectives d'immunsérum et d'antigène à employer*. A ce sujet, on introduit une dose donnée *d'immunsérum* dans le réservoir central et des doses progressivement décroissantes *de toxine servant d'antigène* dans les six réservoirs périphériques. Les boîtes de Pétri ainsi chargées sont déposées dans une chambre humide pendant 3 à 4 jours à la température du laboratoire. Nous donnons ci-dessous le schéma d'une expérience que nous empruntons à titre documentaire à Ritschel-Beurlin.

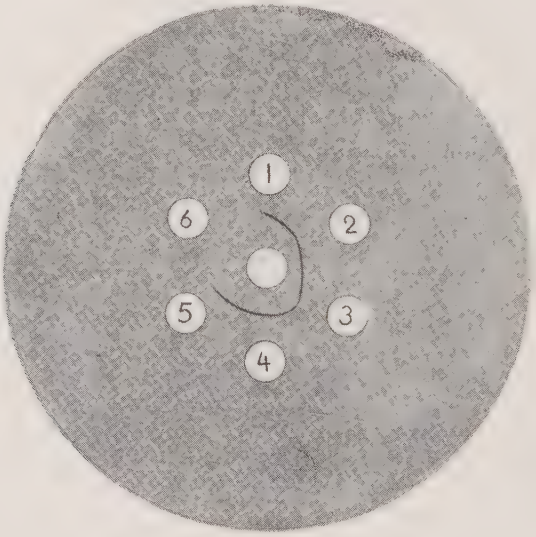


Fig. 1

Réservoir central : Anatoxine à 30 U/cc
Réservoir N° 1 Immunsérum 100 U/cc
Réservoir N° 2 » 50 U/cc
Réservoir N° 3 » 25 U/cc
Réservoir N° 4 » 12,5 U/cc
Réservoir N° 5 » 6,25 U/cc
Réservoir N° 6 » 3,125 U/cc

Cet auteur a introduit dans *le réservoir central l'anatoxine diphtérique pure* (30 U/cc) et dans les réservoirs périphériques *l'immunsérum antidiphtérique* IP à des concentrations allant de 100 U/cc à 3 125 U/cc.

Dans une autre série de boîtes de Pétri, nous avons effectué une expérience inverse : *le réservoir central recevant l'immunsérum* à 25 U/cc *et les réservoirs périphériques* contenant les dilutions progressives de

l'anatoxine allant de 30 à 5 U /cc. Le résultat analytique était identique et l'on peut ainsi contrôler si la gélose se prête à *des réactions de précipitation* et d'autre part déterminer *la concentration d'antigène et d'anticorps donnant l'intensité optimale de précipitation.*

La réaction de précipitation s'observe d'habitude dans les 24 premières heures, mais on a intérêt à suivre le phénomène réactionnel pendant 5 à 6 jours. Connaissant les doses donnant *l'équilibre optimal entre l'antigène et l'immunsérum*, on peut les appliquer *à l'immuno-électrophorèse.*

Pour celle-ci il importe *d'éviter la fixation* qui empêcherait l'élimination des protéines non précipitées; on procède donc à un simple lavage dans des bains successifs de soluté physiologique fréquemment renouvelé.

Ayant ainsi décrit les méthodes qui devaient nous permettre de mettre en évidence *les différentes précipitines pouvant exister dans nos immunsérums de lapin*, nous donnons dans le chapitre suivant le protocole expérimental de nos recherches.

CHAPITRE IV

EXAMEN DES TOXINES EMPLOYÉES

Comme toutes *les exotoxines*, *la toxine staphylococcique* possède deux sortes de propriétés : *toxiques et antigéniques*. Les toxines que nous avons utilisées nous ont été fournies par RICHOU et nous les avons contrôlées au point de vue de *leur pouvoir hémolytique et coagulant, puis de leur action enzymatique en ce qui concerne la fibrinolysine et les lipases*.

A ce sujet, nous avons déjà donné antérieurement les méthodes employées pour mettre en évidence ces propriétés qui présentent un intérêt particulier pour notre travail, puisqu'il importe de mettre en évidences *des précipitines spécifiques de l'une ou l'autre de ces toxines et enzymes*.

En ce qui concerne *l'hémolysine* α, on a intérêt à déterminer la *dose-test hémolytique et la dose minimale hémolytique*.

La dose-test hémolytique ou « *dose combinée hémolytique* » est la plus petite quantité de toxine qui, ajoutée à 1 unité *d'immunsérum antitoxique*, est capable d'hémolyser une goutte d'hématies de lapin lavées trois fois et diluées au tiers.

On opère de la façon suivante : on introduit dans une série de tubes à hémolyse 1 cc d'une dilution de *sérum-étalon*, de sorte que 1 cc de cette dilution renferme 1 unité *antitoxique internationale*, puis des quantités croissantes de *l'hémolysine à titrer*. On ramène chaque mélange au même volume au moyen de soluté physiologique et on ajoute dans chaque tube une goutte d'hématies de lapin. Après agitation, on porte à l'étuve pendant 1 heure. La lecture est faite une heure après la sortie de l'étuve et à la température du laboratoire. Comme *immunsérum-test*, nous avons eu recours au sérum *antistaphylococcique de l'Institut Fédéral de Sérothérapie et Vaccinal de Berne*.

Nous rapportons dans les tableaux suivants les résultats de ces différents titrages sur les diverses toxines entrant dans notre mélange « *polytoxine* ».

TABLEAU N° 1

Toxine N°	Souche de Staphylocoque	Pouvoir hémolytique α		Fibrinolysine	Coagulase
		D.T.H.	D.M.H.		
2165	Vache U.	0,07—0,10	1/1200	— 1	+
2166	Vache U.	0,10—0,20	1/800	— 1	+
2163	Bouley	0,20—0,30	1/400	10 — 15	+
2138	532	0,40	1/300	— 1	—
2171	Chien 53	0,10—0,20	1/800	— 1	—
2155	Wood	0,20—0,30	1/400	7 — 10	+
2158	Wood	0,30—0,40	1/300	20 — 30	+
2153	Wood	0,30—0,40	1/300	30 — 50	+

TABLEAU N° 2

Toxine N°	Souche de Staphylocoque	Titre (en unités) vis-à-vis :			
		Jaune d'œuf	Huile de maïs	Lécithine	Caséine
2165	Vache U.	— 1	— 1	— 1	— 1
2166	Vache U.	— 1	— 1	— 1	— 1
2163	Bouley	10 — 300	30 — 50	— 1	— 1
2138	532	100— 30	10 — 30	— 1	3 — 10
2171	Chien 53	50— 100	10 — 30	— 1	— 1
2155	Wood	1 — 3	3 — 10	— 1	1 — 3
2158	Wood	— 1	— 1	— 1	— 1
2153	Wood	— 1	1 — 3	— 1	1 — 1

On voit que ces souches diffèrent beaucoup en ce qui concerne leurs propriétés antigéniques et enzymatiques.

Pour nos essais, nous avons eu recours à 30 lapins mâles âgés de 6 mois environ, et pesant 2 à 3 kg; nous avons toujours sélectionné plusieurs animaux d'une même nichée élevés et soignés dans des conditions sensiblement identiques pour toutes les séries d'essais. Avant le prélèvement de sang, on les a laissés à jeun pedant 24 heures. Tous les animaux étaient examinés avant le traitement et groupés ensuite en séries sur lesquelles nous avons effectué les prélèvements de sang destinés à l'électrophorèse sur papier avant de procéder à la vaccination respective. Nous donnons dans le tableau suivant *les valeurs électrophorétiques* de ces 30 lapins.

TABLEAU N° 3

Lapin N°	Albumine g °/oo	GLOBULINES			Rapport γ-globulines / albumines
		α	β	γ	
1	59,2	15,6	11,8	13,4	0,23
2	63,4	16,2	9,7	10,7	0,17
3	67,0	11,0	10,1	11,9	0,19
4	62,9	9,4	11,9	15,8	0,25
5	65,5	7,5	8,8	18,2	0,28
6	63,5	12,3	10,4	13,8	0,22
7	62,1	12,0	14,4	11,6	0,22
8	63,2	13,0	10,3	13,5	0,21
9	62,8	13,4	8,4	15,4	0,25
10	59,4	15,8	13,2	11,7	0,20
11	67,1	11,4	10,3	11,2	0,17
12	58,4	12,8	11,3	17,5	0,30
13	67,6	8,7	12,5	11,2	0,17
14	55,7	12,6	14,3	17,4	0,31
15	62,4	8,4	13,7	15,5	0,25
16	66,8	11,3	8,4	13,5	0,20
17	59,4	9,9	13,2	17,7	0,30
18	59,4	13,1	15,8	11,7	0,20
19	59,5	10,2	11,3	19,0	0,32
20	61,8	7,9	12,5	17,8	0,29
21	62,0	12,4	9,8	15,8	0,25
22	63,6	9,3	10,3	16,8	0,26
23	60,2	11,4	10,9	17,5	0,29
24	64,2	10,6	10,0	15,2	0,29
25	61,3	10,6	12,9	15,2	0,25
26	62,6	11,6	12,1	13,9	0,22
27	63,8	12,0	12,0	12,2	0,19
28	63,2	10,1	13,0	13,7	0,21
29	66,7	11,1	8,9	13,3	0,20
30	65,5	9,7	8,4	16,4	0,25

Nous avons tenu à donner *le rapport γ-globulines/albumines* qui, d'après les travaux de HEYMANN et WAHLIG (48) illustre le mieux les modifications *du spectre protéique du sérum, consécutives à la vaccination et à la formation des anticorps*. Au cours de leurs expériences, ces auteurs ont trouvé un rapport normal moyen de 0,21 et ce rapport augmente à la suite de la vaccination. Comme ZANDER (49) l'a déjà fait remarquer, on se rend compte que ces résultats sont tout à fait relatifs, puisque pour nos animaux ce rapport est compris entre 0,17 et 0,32. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce fait.

Technique de vaccination :

Essai préliminaire :

Notre travail a trait à la mise en évidence *des précipitines* par l'analyse immuno-électrophorétique. Nous avons dû préparer tout d'abord un immunsérum de lapin traité uniquement avec le milieu de culture de choix employé pour la préparation des toxines staphylococciques. Françoise Guillaume (4) a montré l'importance de ce milieu pour l'obtention d'une bonne toxine. Elle a retenu le milieu R.A.P. de Boivin et Richou composé d'après les essais de base de Ramon, Amoureux et Pochon (50), d'où son nom : « Milieu R.A.P. ». Il doit être préparé avec beaucoup de soin et nous tenons à donner la description détaillée d'après Richou.

On chauffe trois litres d'eau de robinet à 50° au bain-marie. On y introduit 650 g de viande de cheval hachée, débarrassée du tissu conjonctif et de la graisse. Agiter souvent et porter à nouveau à la température de 50° (ce qui demande 10 minutes environ). Ajouter alors 5 g de Papaïne soigneusement délayée dans un peu d'eau tiède. On fait monter lentement la température jusqu'à 70°, ce qui doit prendre environ 25 minutes; d'après Richou ce temps est très important. Arrêter ensuite le chauffage au bain-marie pendant 10 minutes, à ce moment la température intérieure du flacon atteint à peu près 75°. Retirer du bain-marie et filtrer le substrat à chaud sur papier Chardin. Le pH est de 6,8, on l'ajuste à 7,4 aussitôt après la filtration, ce qui demande environ 80 cc de lessive de soude à 80 g °/₀₀ pour un volume total de 5 400 cc de bouillon ainsi préparé. On porte alors à l'autoclave à 110° pendant 15 minutes pour précipiter les phosphates et les autres substances de ballast. On filtre à chaud et on laisse refroidir jusqu'à la température du laboratoire. A ce moment le pH est d'environ 7,8 à 8,0. On doit le réajuster à pH = 7,4 à l'aide d'acide chlorhydrique pur. Il faut environ 2,75 cc pour 3 litres de bouillon. On répartit ensuite en tubes que l'on stérilise pendant 45 minutes entre 112° et 115°.

C'est ce milieu que nous avons employé pour injecter nos lapins normaux, afin de préparer un immunsérum-test qui devait nous permettre de contrôler les précipitines indépendantes de l'action des toxines et enzymes staphylococciques. A cet effet, nous avons vacciné six lapins de la façon suivante : le milieu R.A.P. a été mélangé avec un adjuvant du genre de Freund et Dermott (50 a) :

Milieu R.A.P.	0,8 cc
Suspension de B.C.G. tués en solution physiologique	0,5 cc
Huile de paraffine	0,5 cc
Tween 80	0,2 cc

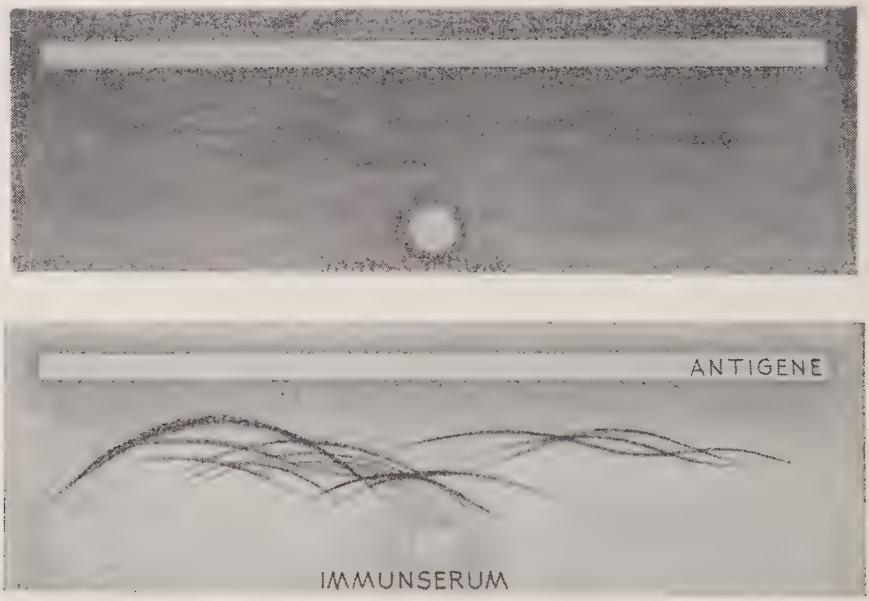
Après homogénéisation de ce mélange, nous avons injecté par voie sous-cutanée :

la 1re semaine 1 cc, la 2e semaine 1,5 cc, la 3e semaine 2 cc, puis les 4e et 5e semaines 0,5 cc + 1 cc de milieu R.A.P. pur sans adjuvant.

Quatre semaines plus tard, nous avons pratiqué une injection de réactivation avec 2 cc de milieu R.A.P. pur. Le prélèvement de sang est pratiqué 10 jours après cette dernière injection. Le sérum des six lapins a été mélangé et réparti aseptiquement en ampoules scellées.

Cet immunsérum anti-milieu R.A.P. a été soumis à l'immuno-électrophorèse en gélose en présence de *milieu R.A.P.* comme antigène. Les volumes de milieu R.A.P. soumis à l'analyse ont été de 1,0 cc et ceux des immunsérums employés pour le développement des lignes de précipitation spécifiques étaient de 0,2 cc. Pour les détails de la technique nous renvoyons au chapitre qui y a été consacré.

Nous donnons ci-dessous à titre explicatif cet électrophorégramme et son schéma.



↑ Sérine-Albumine (1) ↑ ↑ β_2-Globulines (2) ↑
↑ α_1-Globulines (3) ↑ ↑ ..... γ-Globulines.... (1) .....↑
↑ α_2-Globulines (5) ↑
↑ β_1-Globulines (2) ↑

Fig. 2 — Immuno-électrophorégramme Milieu R.A.P. (antigène) — immunsérum de lapin anti-R.A.P.

En parcourant la plaque de gélose de l'anode à la cathode, on constate le même fractionnement des protéines que dans l'électrophorèse sur papier; en effet, on note les groupes de l'albumine, des α_1 - α_2 - β_1 - β_2 et

γ-globulines. Comme Moretti *et ses collaborateurs* (51) le proposent, on peut donner des numéros aux lignes de précipitation en allant de l'anode vers la cathode ou de la rigole de départ vers le godet de l'immunsérum, ce qui facilite l'interprétation du processus électrophorétique.

La ligne de précipitation de l'albumine ne présente pas de difficulté d'interprétation: elle fournit en effet la ligne en arc la plus intense du côté de l'anode. En ce qui concerne les α_1-globulines évoluant dans la même zone électrophorétique nous remarquons une précipitation en trois fractions; les deux premières sont situées dans le creux de l'arc des sérines-albumines, elles sont assez fines et semblent correspondre d'après la plupart des auteurs à des fractions des lipoprotéines. La troisième bande, placée au-dessous des deux premières, est plus prononcée et semble divisée en deux lignes à son départ, dont la première disparaît très rapidement. Grabar et les autres auteurs l'attribuent, pour l'immunsérum humain, à une post-albumine: nous croyons cependant qu'elle pourrait être en rapport avec des traces d'hémoglobine qui se trouvent toujours dans les sérums de lapin: il s'agirait donc d'un anticorps antihémoglobinique.

Le groupe des α_2-globulines chevauche avec celui des α_1-globulines immédiatement à proximité de la ligne des Serines-Albumines, vers la cathode, en cinq lignes sensiblement parallèles. Les lignes N° 1 et 2 semblent correspondre, d'après les immunologistes, à des α_2-lipoprotéines: les lignes N° 3 et 4 relèvent des haptoglobulines 1 et 2. Nous remarquons ensuite une cinquième ligne intercalée entre ces deux groupes, ligne assez prononcée et qui pourrait être le résultat d'une interaction entre un antigène et la précipitine correspondante. Cette ligne se prolonge assez loin vers la zone cathodique.

Pour le groupe des β_1-globulines, nous ne relevons que deux lignes, formant arc aplati et s'étalant de part et d'autre du godet de départ et dont l'interprétation immunologique paraît très difficile. Dans la zone de précipitation des β_2-globulines, située à droite du godet, nous remarquons deux lignes très prononcées; dans leur étude au moyen du sérum humain, Moretti et ses collaborateurs estiment que les précipitines des β_2-globulines seraient dues à une pré-albumine et à une macro-globuline. Étant donné que Grabar et Courcon (52) n'ont pu relever qu'une ligne de précipitation de β_2-globulines dans *leur immuno-électrophorèse de sérum de lapin révélé par un immunsérum anti-lapin provenant de boucs*, nous croyons que la deuxième ligne que nous constatons est due à une précipitine spéciale, peut-être due à la substance adjuvante.

Quant aux γ-globulines, nous ne notons qu'une seule ligne de précipitation assez fine et qui s'étend de la région cathodique jusqu'à la zone des α_2-globulines.

L'ensemble de notre protéinogramme permet donc de déceler 14 lignes de précipitation, dont le nombre le plus important est dû aux α-globulines. L'immuno-électrophorégramme de Grabar et Courcon

obtenu à l'aide *du sérum de lapin + immunsérum de bouc* n'a révélé qu'une douzaine de constituants, que les auteurs classent de la façon suivante : la sérine-albumine, un constituant ayant une mobilité des globulines α_1, au moins 3 et probablement 4 globulines α_2, 2 ou 3 constituants dont les mobilités sont intermédiaires entre celles des globulines α_2 et β_1 *du sérum humain*, au moins 2 globulines β_1, au moins une globuline β_2 qui forme comme la β_2 *du sérum humain* un arc aplati et la globuline γ, dont la ligne s'étend comme dans les autres cas décrits par ces auteurs, jusque dans la zone des globulines α_2.

Nous pouvons ainsi dire que, pour notre immunsérum anti-R.A.P., les α_1- globulines ont un plus grand nombre de précipitines et *les bandes intermédiaires* de GRABAR entre α_2 et β_1-globulines n'existent pas dans notre protéinogramme, qui montre deux lignes de plus dans les α_2-globulines. De l'ensemble de *notre immuno-électrophorèse*, on peut conclure que les précipitines apparaissant dans *l'immunsérum anti-R.A.P.* migrent surtout avec les α- globulines et les β_2-globulines. Dans la bande des γ-globulines, nous ne relevons ici aucune particularité immunologique.

Vaccination avec les toxines staphylococciques :

Comme nous l'avons dit antérieurement, nous avons tout d'abord eu recours à *une polytoxine constituée par un mélange de toxines* désignées par RICHOU par les N^{os} 2138 - 2153 - 2155 - 2158 - 2163 - 2165 - 2166 - 2171. Nous avons intentionnellement chosi *ces toxines* qui, comme nous l'avons fait ressortir, renferment *un nombre d'antigènes et d'enzymes varié*, de sorte que *notre polytoxine* peut être considérée comme un mélange renfermant *le maximum d'antigènes et d'enzymes élaborés par les Staphylocoques pathogènes.*

A l'aide de *cette polytoxine*, nous avons vacciné *six lapins* selon la technique décrite dans le Chapitre III; ces animaux ont été divisés en deux séries, dont la seconde a reçu en plus *le Bépanthène*. Il en a été de même pour toutes nos autres expériences, et nous reviendrons plus loin sur ces deuxièmes séries d'essais.

Quatre lapins ont reçu un mélange de toxines 2165 (Vache U.) + 2171 (Chien 53) ; celles-ci ont été choisies intentionnellement, puisqu'elles renferment spécifiquement des *hémolysines* α et, comme il s'agit *de Staphylocoques d'origine animale, également des hémolysines* β.

Pour déceler éventuellement *les précipitines anti-hémolysine* α, nous avons vacciné *quatre autres lapins* avec le même mélange, mais chauffé à 60° pendant 35 minutes, *détruisant ainsi complètement l'hémolysine* α, alors que *l'hémolysine* β résiste à ce chauffage.

Pour essayer de mettre en évidence *les précipitines antifibrinolysines* nous avons vacciné *quatre lapins* avec le mélange de toxines 2158 (Wood) + 2163 (Bouley) possédant *un taux de fibrinolysine très élevé*. Pour éliminer *les hémolysines* α et β, nous avons chauffé ce mélange à

56° pendant trois heures: dans ces conditions, *seule la fibrinolysine* survit qui n'est détruite que par un chauffage à 100° pendant 1 heure et résiste intégralement à 56°, d'après les travaux de Saladin (53).

Quatre autres lapins ont été vaccinés au moyen des toxines 2138 (532) + 2171 (Chien 53) *qui*, comme cela ressort de notre tableau relatant les propriétés antigéniques de ces toxines, *sont dépourvues de fibrinolysine et de coagulase*. Notons que d'après les travaux de Rammelkamp *et ses collaborateurs* (54) *la coagulase staphylococcique* n'a pas de propriété antigénique chez le lapin, le canard et la poule, et aurait seulement un faible pouvoir antigénique chez le singe. Cette série sert donc de témoin à la série d'épreuve précédente.

Un autre groupe de huit lapins a été choisi pour la mise en évidence *des précipitines antilipasiques*. A ce sujet, nous avons constitué une série de 4 lapins qui ont été vaccinés avec les souches 2163 (Bouley) + 2171 (Chien 53) *qui renferment essentiellement des lipases;* ce mélange de toxines a été chauffé à 56° pendant trois heures pour détruire les hémolysines α et β, alors que d'après Villiger (55) les lipases proprement dites purifiées résistent facilement à cette température. *La deuxième série (témoin)* comportant 4 lapins a été vaccinée avec les souches 2165 (Vache U.) + 2158 (Wood) *dépourvues de lipase.*

TABLEAU N° 4

Lapin N°	injection de :	Lapin N°	injection de :
1	Polytoxine	2	Polytoxine + Bépanthène
3		4	
5		6	
7	2165 + 1271	8	2165 + 2171 + Bépanthène
9		10	
11	2165 + 2171 chauffé	12	2165 + 2171 + Bépanthène
13		14	
15	2158 + 2163	16	2158 + 2163 + Bépanthène
17		18	
19	2138 + 2171	20	2138 + 2171 + Bépanthène
21		22	
23	2163 + 2171	24	2163 + 2171 + Bépanthène
25		26	
27	2165 + 2158	28	2165 + 2158 + Bépanthène
29		30	

Nous avons donc utilisé *dans l'ensemble trente lapins*, dont 15 servaient à la vaccination *avec les toxines seules et les* 15 *autres recevaient une thérapie associée de vaccin — Bépanthène*. Pour plus de clarté, nous rapportons dans le tableau N° 4 le schéma de ces vaccinations.

Les séries de lapins traités avec *le Bépanthène* ont reçu à partir de la 6e semaine et deux fois par semaine 0,5 cc — 0,125 g *de Pantothénol en injections sous-cutanées*. Dans la semaine suivant la dernière vaccination, nous avons encore injecté deux fois 0,5 cc *de Bépanthène*. Le prélèvement de sang a été effectué pour tous les lapins 12 jours après la dernière piqûre vaccinale.

Pour pratiquer *l'immuno-électrophorèse* nous avons mélangé les sérums des lapins de chaque série.

Premier groupe

Lapins traités à la polytoxine seule et associée au Bépanthène :

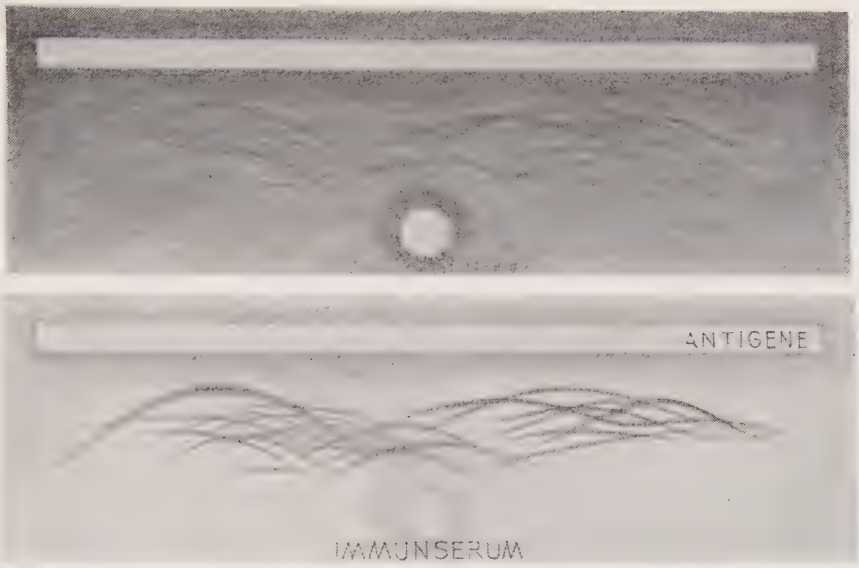
Au cours de tous nos essais nous nous référons pour les valeurs témoin *au protéinogramme réalisé à l'aide de l'immunsérum de lapin anti-R. I.P.* Pour les trois lapins traités *à la polytoxine seule* l'immuno-électrophorèse nous a révélé les lignes de précipitation suivantes :

TABLEAU N° 5

Protéines	Témoin	Polytoxine seule	Soit en plus	Polytoxine + Bépanthène	Soit en plus
Albumine	1	1	—	1	—
α_1-glob.	3	5	2	5	2
α_2-glob.	5	6	1	6	1
β_1-glob.	2	3	1	3	1
β_2-glob.	2	4	2	4	2
γ-glob.	1	3	2	3	2
	14	22	8	22	8

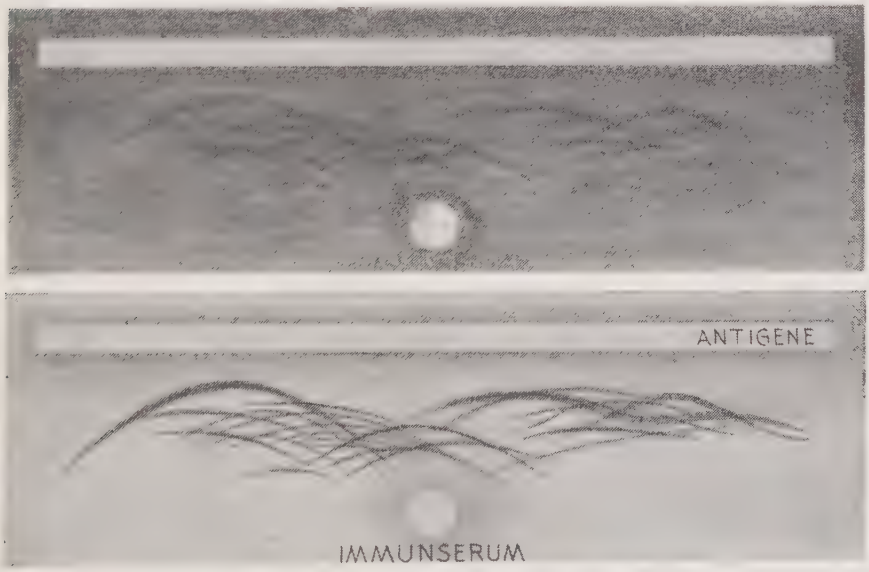
Interprétation :

On voit tout d'abord que la vaccination au moyen de *la polytoxine* a augmenté toutes les lignes de précipitation concernant les globulines. Cette réaction d'immunité se manifeste principalement sur les α_1, β_2 et γ-globulines. Dans l'ensemble, on se rend compte que cette polytoxine doit contenir au moins 8 produits agissant comme antigène ; il est surprenant que *l'immunisation* se manifeste par des précipitines *du groupe des α-globulines*, nous aurons l'occasion de revenir sur cette question. Le processus immunologique apparaît surtout vis-à-vis des β_2 et γ-globulines.



Sérine-Albumine (1) ↑ ↑ β_2-Globulines (2+2) ↑
↑ α_1-Globulines (3+2) ↑ ↑ γ-Globulines (1+2) ↑
α_2-Globulines (5+3) ↑
↑ β_1-Globulines (2+2) ↑

Fig. 3. — Polytoxine staphylococcique (antigène) + immunsérum de lapin traité à la polytoxine seule.



↑ Sérine-Albumine (1) ↑ ↑ β_2-Globulines (2+2) ↑
↑ α_1-Globulines (3+2) ↑ ↑ γ-Globulines (1+2) ↑
↑ α_2-Globulines (5+3) ↑
↑ β_1-Globulines (2+2) ↑

Fig. 4. — Polytoxine staphylococcique (antigène) + immunsérum de lapin traité à la polytoxine + pantothénol.

En ce qui concerne *le protéinogramme* obtenu au moyen de l'immunsérum des animaux traités par *la polytoxine et le pantothénol*, nous ne remarquons pas de différence quantitative au point de vue des lignes de précipitation: qualitativement cependant, on note une plus forte intensité de la ligne 1 des γ-globulines et des lignes 3 et 4 des β_2-globulines.

Nous illustrons ces résultats par les figures 3 et 4 avec leurs schémas expliquant d'une façon démonstrative les modifications de l'immunoélectrophorèse dues à ces traitements.

Deuxième groupe

Lapins traités par les toxines 2 165 + 2 171 seules et associées au Bépanthène :

Les sérums des deux lapins vaccinés avec les deux toxines spécifiquement hémolysantes ont donné les résultats suivants :

TABLEAU N° 6

Protéines	Témoin	Toxines seules	Soit en plus	Toxines + Bépanthène	Soit en plus
albumine	1	1	—	1	—
α_1-glob.	3	3	—	5	2
α_2-glob.	5	5	—	6	1
β_1-glob.	2	2	—	2	—
β_2-glob.	2	3	1	3	1
γ-glob.	1	3	2	3	2
	14	17	3	20	6

Troisième groupe

Lapins traités par les mêmes toxines chauffées :

Ce groupe devait nous servir de témoin pour l'essai précédent, et les toxines ont été chauffées à 60° pendant 35 minutes pour détruire *l'hémolysine* α.

TABLEAU N° 7

Protéines	Témoin	Toxines seules	Soit en moins	Toxine + Bépanthène	Soit en moins
Albumine	1	1	—	1	—
α_1-glob.	3	2	—1	3	—
α_2-glob.	5	3	—2	3	—2
β_1-glob.	2	2	—	2	—
β_2-glob.	2	1	—1	2	—
γ-glob.	1	1	—	1	—
	14	10	—4	12	—2

Interprétation :

En considérant tout d'abord l'expérience avec les toxines contenant essentiellement *les hémolysines*, on constate que celles-ci agissent sur le processus immunologique surtout en modifiant les β_2 et les γ-globulines En effet, nous trouvons *une ligne de précipitation supplémentaire des β_2-globulines et deux lignes supplémentaires pour les γ-globulines.* La ligne 2 des γ-globulines prend naissance du côté cathodique simultanément avec la ligne 1 normale, elle dévie très peu de cette dernière et est relativement courte; la ligne 3, par contre, est tout à fait indépendante de la ligne normale; partant du côté cathodique, elle évolue en S jusque dans la zone anodique. Son point de départ se situe presque au niveau de l'arrêt de la ligne 2. *Les hémolysines semblent donc agir comme un antigène complet spécifique*, se manifestant surtout par leur action sur les γ-globulines.

L'addition de Bépanthène au cours de la vaccination a encore augmenté *le nombre de précipitines ;* cette augmentation se manifeste surtout sur les α_1 et α_2-globulines. Ce fait pourrait s'expliquer par l'intervention de *l'acide pantothénique en tant que groupement prosthétique de la coenzyme A* qui participe, comme nous le savons, *aux réactions d'acétylation, d'oxydation et de synthèse des acides gras et des stérols.* D'autre part, elle intervient dans le cycle de KREBS et dans la formation de *l'acétylcholine.* Nous croyons que *l'acide pantothénique* intervient ici dans la formation d'anticorps inhibant certaines réactions qui gênent la synthèse des acides gras et stérols au cours du processus immunologique, de sorte que *l'association du Bépanthène avec les toxines staphylococciques* protège certains facteurs du métabolisme lipidique, puisque nous savons que *les lipoprotéines* dépendent surtout des α-globulines.

Dans le cas *des hémolysines, le Bépanthène* ne semble pas avoir d'action directe sur *les anticorps immunisants vrais.* Pour élucider ce problème, nous aurions dû prolonger nos essais en prélevant le sang après 3 ou 4 mois.

En comparant les résultats ainsi obtenus avec ceux de la série témoin, traitée avec *les toxines débarrassées par chauffage de l'hémolysine* α, nous constatons *une nette diminution* du nombre des lignes de précipitation par rapport à l'immunsérum de lapin anti-milieu R.A.P. Le chauffage n'a donc pas seulement détruit *l'hémolysine* α, mais a provoqué la disparition d'autres antigènes thermolabiles. Ce fait se manifeste surtout pour les α-globulines et les β_2-globulines. *L'acide pantothénique* paraît intervenir ici *comme réactif protecteur de détoxication*, puisque le processus immunisant se manifeste chez les α_1 et les β_2-globulines. Ce fait semble imputable pour les α_1-globulines au rôle de *la coenzyme* A *dans le métabolisme lipidique* et pour les β_2-globulines à *la protection d'anticorps immunisants vrais* et nous pensons à ce sujet à l'hémolysine β qui pourrait engendrer des anti-hémolysines spécifiques.

Quatrième groupe

Lapins traités par les toxines 2 158 + 2 163 seules et associées au Bépanthène :

Nous avons employé ces deux toxines, puisque lors de nos expériences préliminaires nous avons constaté qu'elles contiennent un taux élevé *de fibrinolysine ;* comme elles possèdent en même temps *un pouvoir hémolytique* assez prononcé, nous avons chauffé le mélange des toxines pendant 3 heures à 56° pour détruire *les hémolysines* α et β.

TABLEAU N° 8

Protéines	Témoin	Toxines seules	Soit en plus	Toxines + Bépanthène	Soit en plus
Albumine	1	2	1	3	2
α_1-glob.	3	3	—	3	—
α_2-glob.	5	5	—	6	1
β_1-glob.	2	3	1	3	1
β_2-glob.	2	4	2	4	2
γ-glob.	1	1	—	2	1
	14	18	4	21	7

Cinquième groupe

Lapins traités par les toxines 2 138 + 2 171 seules et associées au Bépanthène :

Afin de pouvoir déterminer le pouvoir antigénique de *la fibrinolysine sur la formation des précipitines spécifiques*, nous avons choisi deux toxines dépourvues de cette enzyme, ainsi que de coagulase et qui nous ont donné les résultats suivants après chauffage à 56° pendant 3 heures.

TABLEAU N° 9

Protéines	Témoin	Toxines seules	Soit en moins	Toxines + Bépanthène	Soit en plus ou moins
Albumine	1	1	—	2	1
α_1-glob.	3	2	—1	2	—1
α_2-glob.	5	3	—2	3	—2
β_1-glob.	2	1	—1	2	—
β_2-glob.	2	1	—1	2	—
γ-glob.	1	1	—	1	—
	14	9	—5	12	+ 1 et — 3

Interprétation :

Nous remarquons que *la fibrinolysine* intervient dans le processus immunologique, surtout sur les albumines et les β-globulines. Il doit donc s'agir ici de *deux processus de défense différents*, l'un jouant surtout sur le métabolisme lipidique et l'autre dans le processus immunologique proprement dit. En comparant les deux séries d'animaux traités avec *les toxines seules ou associées à l'acide pantothénique, nous remarquons une augmentation des précipitines sous l'influence de ce dernier.* Cet effet se fait surtout remarquer sur les albumines, les α_2-globulines et les β_2-globulines qui tout en étant quantitativement identiques se différencient par *l'intensité plus prononcée* des lignes de précipitation. D'autre part, il apparaît *une deuxième ligne de précipitation dans les γ-globulines. L'acide pantothénique* semble donc avoir un effet stimulant prononcé sur *l'immunisation antifibrinolytique ;* ce fait ressort également *du deuxième groupe d'animaux témoins*, par l'augmentation des lignes de précipitation chez les animaux soumis au traitement associé : *l'influence de l'acide pantothénique* se fait remarquer également sur les précipitines agissant sur les sérines-albumines et sur les β-globulines. Il nous paraît très difficile d'expliquer le processus immunologique qui intervient contre *ces toxines fibrinolytiques :* nous tenons à attirer l'attention sur *quelques facteurs inhibiteurs ou frénateurs intervenant dans les processus fibrinolytiques* en général. On sait en effet que normalement le sérum et les urines contiennent *un inhibiteur de la fibrinolysine : l'antifibrinolysine. Ce sont ces anticorps* qui doivent apparaître en excès lors de la vaccination au moyen de nos toxines staphylococciques. *La fibrinolysine* est notoirement un inhibiteur de la genèse de *la prothombine* et freine par conséquent la formation de *la fibrine.* D'autre part, il existe un certain nombre de *facteurs frénateurs de la fibrinolyse* qui ne sont pas encore entièrement définis; celle-ci est activée par *la trypsine et il existe un inhibiteur thermolabile de ce ferment.* On considère cet inhibiteur comme une fraction labile de *l'antifibrinolysine* et il est lié *aux sérines-albumines.*

C'est peut-être ce facteur qui intervient dans la formation *des lignes de précipitation supplémentaires relevées dans nos immuno-électrophorèses ;* la destruction de ce facteur inhibiteur favorise l'apparition *des antifibinolysines.*

En ce qui concerne *les précipitines* agissant dans les zones des β-globulines, nous attirons l'attention sur l'existence de *deux inhibiteurs* décelés dans les urines, thermostables et résistant pendant 60 minutes à un chauffage à 100°. L'un de ces facteurs migre avec les α_1-globulines et l'autre avec les α_2-globulines; ce dernier paraît avoir une action très prononcée sur *la profibrinolysine* même.

L'augmentation *des précipitines* agissant dans la zone des α-globulines pourrait donc être imputable à la disparition de ces inhibiteurs, stimulant *les antifibrinolysines* au cours de l'acte d'immunisation. Ce fait nous paraît très intéressant, surtout en considération de *l'action stimulante de l'acide pantothénique* qui, comme nous le savons par les travaux d'Ostrom (56), favorise également la genèse de *la prothrombine.* Nous voyons ainsi que la vaccination au moyen *de toxines fibrinolytiques des Staphylocoques* se manifeste sur l'ensemble des fractions protéiques que nous pouvons séparer par l'immuno-électrophorèse.

Sixième groupe

Lapins traités par les toxines 2 163 + 2 171 seules et associées au Bépanthène :

Pour contrôler l'action *des antilipases*, nous avons employé *ces toxines* qui présentaient le taux le plus élevé au point de vue *action lipolytique.* Ici aussi, nous avons chauffé le mélange à 56° pendant 3 heures pour détruire *les hémolysines*, sachant que les lipases sont stables dans ces conditions.

TABLEAU N° 10

Protéines	Témoin	Toxines seules	Soit en plus	Toxines + Bépanthène	Soit en plus
Albumine	1	1	—	1	—
α_1-glob.	3	3	—	4	1
α_2-glob.	5	6	1	6	1
β_1-glob.	2	2	—	3	1
β_2-glob.	2	4	2	4	2
γ-glob.	1	1	—	2	1
	14	17	3	20	6

Septième groupe

Lapins traités par les toxines 2 165 + 2 158 seules et associées au Bépanthène :

Nous avons choisi ces deux toxines, dont l'une provient *d'un Staphylocoque d'origine animale et l'autre d'un germe d'origine humaine*, parce qu'elles ne présentent pas de *propriété lipolytique et leur pouvoir hémolytique* a été détruit par chauffage à 56° pendant 3 heures. Notons que nous aurions pu recourir à l'emploi *d'une lipase purifiée, d'après la technique de* VILLIGER, mais nous avons préféré avoir recours à *des toxines* pour les comparer avec le groupe précédent.

TABLEAU N° 11

Protéines	Témoin	Toxines seules	Soit en moins	Toxines + Bépanthène	Soit en moins
Albumine	1	1	—	1	—
α_1-glob.	3	2	—1	2	—1
α_2-glob.	5	2	—3	3	—2
β_1-glob.	2	2	—	2	—
β_2-glob.	2	2	—	2	—
γ-glob.	1	1	—	1	—
	14	10	—4	11	—3

Interprétation :

Dans le sixième groupe, on constate que *les anticorps antilipasiques* se trouvent essentiellement *dans les zones des* α et β-*globulines*.

En ce qui concerne *l'immunsérum obtenu au moyen du traitement combiné*, ce fait devient encore plus apparent, puisque nous trouvons dans la zone des α-*globulines* 10 lignes de précipitation et dans celles des β-globulines 7 lignes. Il semble surprenant que *ces immunsérums possèdent des anticorps agissant dans la zone des* γ-*globulines* et nous aurons l'occasion de revenir sur ce fait. Notons cependant que, comme KROEHNE et VILLIGER l'ont constaté *les caractères antigéniques de ces lipases bactériennes* indiquent qu'elles donnent naissance à *des anticorps rentrant dans le groupe d'Ehrlich*, agissant sans intervention du complément. *Les antilipases* semblent donc être *des précipitines vraies* exerçant leur action essentiellement dans *les zones des lipoprotéines*. En effet, nous savons que *les lipides* se trouvent essentiellement fixés sur les α_1-globulines et les β_2-globulines. Par la méthode de COHN on a pu déterminer deux groupes, l'un apparaissant das la fraction IV-1, l'autre dans la fraction III-0. *A l'électrophorèse de zone* ces deux groupes se comportent comme des éléments originaux, dont la mobilité ne se superpose pas exactement à celle des *protéines non lipidiques*. Le groupe isolé avec la fraction IV-1 évolue avec une mobilité telle qu'il chevauche *sur les albumines et les globulines* α; le groupe isolé par la méthode III-0 évolue avec une mobilité telle qu'il se situe au niveau ou un peu en ar-

rière *des globulines* β. On observe en outre un groupe d'importance moindre qui coïncide avec *les globulines* α_2. *La méthode immuno-chimique* utilisée par Gitlin sur *des lipoprotéines* β montre l'hétérogénéité du groupe qui paraît composé des diverses lipoprotéines qui se retrouvent en quantité inégale dans les deux fractions protéiniques.

Le fait que *les antilipases* se manifestent dans ces zones spécifiques ne paraît donc pas surprenant. Cependant, il faut insister sur l'apparition de *deux lignes de précipitation dans les zones des* γ*-globulines à la suite du traitement par l'acide pantothénique*, puisque dans ce cas nous avons affaire à *un processus immunologique spécifique*. Ce fait semble également parler en faveur de la complexité probable du groupe des γ-globulines.

Dans le groupe sept, où les expériences sont effectuées avec *les immunsérums-témoin, dépourvus de lipases*, nous notons la médiocrité du processus immunologique, puisque les lignes de précipitation révélées sont en général *inférieures à celles de l'immunsérum de lapin anti-milieu R.A.P.* Ceci prouve donc le bien-fondé de notre technique et *la spécificité des divers anticorps* agissant en tant que précipitines, en rapport avec *les différents antigènes qui se trouvent dans les toxines des Staphylocoques.*

L'ensemble de nos expériences démontre également que ces toxines sont polyvalentes et l'on ne peut pas parler d'unicité d'antigènes.

L'étude des antigènes des Staphylocoques par la double diffusion a été entreprise ces dernières années par plusieurs chercheurs et on trouvera la biliographie sur cette question dans le rapport général d'Oeding (57) et dans la monographie d'Elek (58). On a décrit plusieurs lignes de précipitation, parfois jusqu'à sept, dont certaines correspondent *aux réactions toxine-antitoxine*, les autres aux réactions *antigènes bactériens-anticorps*. Dans leur exposé, Madame Grabar et ses collaborateurs (59), dont la publication vient de paraître au moment où nous avons mis sous presse notre travail, pensent que le nombre des lignes semble être en rapport avec les antigènes utilisés. Nous croyons que les différentes techniques d'immunisation jouent également un rôle important sur l'apparition quantitative et qualitative des précipitines. Ces faits pourraient peut-être expliquer les raisons de la divergence entre les résultats de Pillet et Orta (60) et ceux de Madame J. Grabar, Toucas et Bonnefoi en ce qui concerne des précipitines communs *des Staphylocoques pathogènes et avirulents*. Nous insistons surtout sur les conclusions de ces derniers chercheurs: « Nous pouvons affirmer que par la méthode de la double diffusion (Ouchterlony) on peut dénombrer plusieurs systèmes différents d'antigènes-anticorps staphylococciques, les différentes présentations du *Vaccin anti-staphylococcique étant l'antigène* qui, injecté au lapin, provoque l'apparition de plusieurs *anticorps précipitants.* » Nous pouvons confirmer pleinement cette interprétation en faisant ressortir les avantages que présente *la méthode d'immuno-électrophorèse en gélose* sur la technique d'Ouchterlony, pour l'identification des différents groupes *d'antigènes-anticorps et d'enzymes-antiferments*, malgré sa mise au point initialement plus délicate et laborieuse.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Au cours de notre travail, nous avons eu recours à *une technique sérologique particulière*, qui n'est pas encore d'un usage courant, mais qui semble destinée à rendre de très grands services pour élucider *les problèmes d'immunologie* encore fortement discutés.

Comme son nom l'indique, *l'immuno-électrophorèse* permet d'effectuer sur un petit échantillon, *une séparation électrophorétique combinée à des réactions immuno-chimiques*. On peut ainsi déceler dans un très petit volume de liquide biologique les différents composants immunologiques et les déterminer qualitativement et quantitativement au moyen *des réactions de précipitation spécifiques*. Cette méthode présente une sensibilité et une spécificité beaucoup plus grandes que celles de la plupart des autres techniques sérologiques tributaires de réactions chimiques ou physiques, souvent trop brutales.

Le principe de *l'immuno-électrophorèse* consiste à introduire dans la gélose le substrat protéinique à étudier et de soumettre cette préparation à un champ électrique. Les différentes fractions protéiniques séparées sont ensuite mises en contact *avec des antigènes à éprouver* et l'on obtient ainsi *des lignes de précipitation en rapport avec la spécificité antigène-anticorps*, mais dépendant en grande partie des concentrations respectives des deux réactifs.

Quatre problèmes nous intéressaient particulièrement : on sait en effet que le problème *de la dualité des anticorps* n'est toujours pas résolu définitivement. On ne s'explique pas encore *le processus immunologique faisant apparaître à la suite de l'injection d'un antigène donné, à la fois des anticorps hémolysants, des agglutinines, des précipitines*, etc. A ce sujet nous tenons à mentionner les résultats obtenus par RITSCHEL-BEURLIN, qui a effectué *des recherches immunologiques sur les anticorps précipitants de la poliomyélite* et qui a noté que *les anticorps hémolysants* apparaissent plus précocement, mais disparaissent plus rapidement que *les précipitines* par exemple. Elle a pu constater une différence individuelle dans la production *des deux sortes d'anticorps. Pour les précipitines*, RITSCHEL-BEURLIN n'a pas pu enregistrer une périodicité cyclique, caractéristique pour *les anticorps de déviation du complément*. D'autre part, elle a constaté que la spécificité *des antigènes poliomyélitiques* semble plus prononcée pour *les précipitines que pour les anticorps hémolysants*. Étant donné les propriétés sérologiques très variées *des toxines staphylococciques*, nous avons résolu de les employer pour contribuer à résoudre la question de *la dualité des anticorps*.

Un autre problème, concernant également *la complexité des anticorps* apparaissant à la suite de l'introduction d'un antigène donné dans un organisme est encore discuté : *la pluralité éventuelle des γ-globulines.* Cette question pourrait trouver sa solution par la technique *d'immuno-électrophorèse* et la caractérisation des différentes fractions protéiniques. C'est ainsi que GRABAR et COURCON mentionnent à la suite de leurs travaux sur *l'immuno-électrophorèse :*

« Des résultats préliminaires acquis récemment avec *un immunsérum anti-sérum humain normal* obtenus chez un cheval en cours d'immunisation, semblent indiquer l'existence des γ-globulines possédant des groupements déterminants distincts ou un nombre différent de ces groupements. Il n'est donc pas impossible que la « *famille des γ-globulines* » composée par des protéines ayant des mobilités différentes, et par conséquent des nombres variés de groupements ionisables, soit *aussi hétérogène du point de vue immuno-chimique* et que ces protéines puissent posséder des groupements antigéniques différents ou un nombre différent de ces groupements, puisque *des anticorps de certains immunsérums* permettent de les distinguer. Cependant toutes ces protéines doivent posséder un ou plusieurs groupements antigéniques communs, puisque d'autres immunsérums ne permettent pas d'observer ces différences et ne forment qu'*une seule ligne continue de précipitation spécifique.* »

Cette hétérogénéité éventuelle de la famille des γ-globulines nous a amené à avoir recours à l'emploi de *l'acide pantothénique* pour la détermination éventuelle plus aisée de ses différents composants. Connaissant la part importante que prend *cette vitamine dans le métabolisme protidique et dans la genèse des anticorps*, il nous a semblé intéressant d'associer cette vitamine au processus d'immunisation.

Au cours de notre travail, nous avons essayé *de rechercher le point d'attaque de l'acide pantothénique* dans les différents métabolismes.

LIPMAN et KAPLAN ont prouvé en 1948 que *l'acide pantothénique* est un composant de *la coenzyme* A et constitue ainsi un élément indispensable à chaque organisme vivant pour *l'anabolisme acétique.* Il est actuellement difficile d'envisager dans tous ses détails *la carence de l'acide pantothénique* dans le métabolisme cellulaire normal et pathologique. NOVELLI la résume de la façon suivante : *arrêt de croissance et perte de poids, dermites, manifestations pathologiques au niveau de la peau et de ses annexes, troubles du tissu nerveux, dysfonctions cortico-surrénaliennes, lésions de l'appareil respiratoire, désordres digestifs et modifications des muqueuses gastro-intestinales, atteinte du métabolisme protidique, modifications des facteurs de la coagulation.* De plus J. MEYER *et ses collaborateurs* ont montré que *l'acide pantothénique interfère avec les fonctions de détoxication, anti-infectieuses et immunobiologiques par la formation de facteurs de défense de l'organisme : complément et anticorps spécifiques.*

WIELAND attribue à *la coenzyme* A l'effet favorable de l'*acide pantothénique* sur tous ces troubles. Nous croyons cependant qu'il faudrait

envisager ce problème sous trois aspects : rôle de l'acide pantothénique *comme composant de la coenzyme* A, *comme vitamine spécifique et comme agent médicamenteux proprement dit.* A la suite des travaux effectués dans le Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg par SARTORY, MEYER et leurs élèves, nous pouvons appuyer la thèse de WIELAND en ce qui concerne l'action favorable de l'*acide panthoténique* en tant que composant de *la coenzyme* A dans certains troubles du système nerveux. On connaît le rôle *de cette coenzyme* dans la biosynthèse de l'*acétylcholine*, dont l'importance pour les fonctions nerveuses a été démontrée par les travaux de BERMAN et ses collaborateurs. On a pu démontrer que *l'oxydation de l'acide pyruvique* est freinée par la carence *en coenzyme* A et *en acétylcoenzyme* A. L'interruption de ce processus métabolique fondamental se répercute sur le système nerveux.

D'autre part, on connaît la richesse de *la cortico-surrénale en coenzyme acétylante*, qui explique le rapport entre l'hypovitaminose B_5 et la dysfonction surrénalienne. Celle-ci provoque une éosinophilie et surtout une lymphopénie ainsi qu'une insuffisance de la glycogenèse hépatique. Nous ouvrons une parenthèse pour insister sur l'importance *du système lymphatique, des lymphocytes et des plasmocytes en particulier, dans la genèse des anticorps.* La carence en *coenzyme* A se manifeste chaque fois qu'un organisme est atteint d'une hypoprotéinémie. En effet, l'organisme est alors obligé d'avoir recours *aux glucidolipides* pour constituer par biosynthèse les acides aminés essentiels.

Le rôle de l'*acide pantothénique comme vitamine essentielle* a été prouvé expérimentalement chez les animaux par l'arrêt de croissance et la perte de poids, puis par des manifestations pathologiques sur la peau et ses annexes.

Le rôle de la vitamine B_5 *comme médicament proprement dit* se manifeste dans un grand nombre d'infections où son administration a un effet spécifique en protégeant le foie dans ses fonctions anti-infectieuses et de détoxication. Nous avons vu le rôle de *l'acide pantothénique* dans le métabolisme des protides, or la formation *des anticorps amène notoirement une modification de la biosynthèse normale des* γ*-globulines.* Un grand nombre de travaux a prouvé que la carence en protides diminue la genèse des anticorps. Les animaux à protéinémie normale, *carencés en acide pantothénique*, sont également impuissant à accroître le taux des anticorps spécifiques et ceci même si l'on stimule l'organisme par des injections de Cortisone ou d'A.C.T.H.

J. MEYER et ses élèves ont pu prouver que *la vitaminothérapie* B_5 active *la formation des anticorps et stabilise pendant une période prolongée leur titre dans le sérum de lapins vaccinés et immunisés contre les Salmonella, les Staphylocoques et les Virus de la poliomyélite.* Ils concluent que l'action de *l'acide pantothénique* se manifeste chaque fois qu'apparaît une déficience dans la genèse des anticorps spécifiques. Ces auteurs ont d'autre part pu mettre en évidence l'influence de cette

vitamine sur *le temps de coagulation et le taux de prothrombine.* Nous voyons ainsi que *l'acide pantothénique* a une influence directe sur les facteurs II - V - VII de la coagulation.

En connaissance de cause, *nous avons donc entrepris nos expériences en nous adressant aux toxines des Staphylocoques.* Ces bactéries élaborent une toxine qui possède de multiples propriétés biochimiques, enzymatiques et sérologiques. *Les toxines* que nous avons utilisées dans notre travail nous ont été fournies par Richou et nous les avons contrôlées au point de vue de *leur pouvoir hémolytique et coagulant, puis de leur action enzymatique en ce qui concerne la fibrinolysine, la caséase, la coagulase et les lipases.*

C'est pour cette raison que dans un chapitre de *notre historique* nous avons insisté sur les méthodes employées pour mettre en évidence ces différentes propriétés qui présentaient un intérêt particulier pour nous, puisqu'il importait de révéler l'existence *des précipitines spécifiques de l'une ou l'autre de ces toxines et enzymes.* Nous avons choisi un certain nombre *de toxines de souches d'origine animale ou humaine* et qui différaient beaucoup dans leurs propriétés antigéniques et enzymatiques. Ce choix nous a permis de sélectionner des mélanges constitués par *des toxines essentiellement hémolysantes*, d'autres surtout à *action fibrinolytique*, d'autres enfin à *pouvoir lipolytique* très prononcé. Au préalable, nous avons fait un mélange de *ces huit toxines* que nous avons désigné par le terme « *polytoxine* » renfermant donc le maximum *des antigènes staphylococciques* et qui nous a servi à vacciner six lapins ; *l'immunsérum ainsi préparé a été soumis à l'immuno-électrophorèse* et nous a permis de révéler *le maximum des anticorps précipitants* engendrés par la vaccination.

Au préalable, nous avons sélectionné trente lapins, dont le sang a été examiné *par électrophorèse sur papier*, afin de contrôler la présence éventuelle d'anticorps qui auraient pu induire en erreur dans l'interprétation du processus d'immunisation artificielle.

Dans le même ordre d'idées, nous avons préparé un immunsérum de lapin anti-milieu R.A.P., substrat de choix de la toxigenèse des Staphylocoques, pour déterminer quantitativement et qualitativement *les précipitines* éventuelles de cet immunsérum anti-R.A.P. Nous avons pu y déceler *une ligne de précipitation pour les sérines-albumines, trois lignes* fractionnées pour les α_1-globulines, quatre ou cinq lignes pour les α_2-globulines, deux lignes pour le groupe des β_1-globulines, deux lignes pour les β_2-globulines ; quant aux γ-globulines nous ne notons qu'*une seule ligne de précipitation assez fine*, s'étendant de la région cathodique jusqu'à la zone des α_2-globulines.

Six lapins ont été vaccinés au moyen de notre polytoxine ; *trois d'entre eux ont reçu en plus le traitement à l'acide pantothénique.* Chaque fois 4 lapins ont été ensuite traités pour contrôler les lignes de précipitation spécifiques pour *les hémolysines, respectivement la fibrinolysine et les précipitines antilipasiques, et ceci par la toxine seule et associée au*

Bépanthène. Pour plus de clarté, nous rapportons *dans le Tableau N°* 4 le protocole de ces expériences. Pour obtenir une hyperimmunisation nous avons employé une technique de vaccination prolongée s'étendant sur 6 semaines, et les prélèvements de sang ont été effectués 12 jours après la dernière injection.

Au cours de ces expériences nous avons pu relever 14 lignes de précipitation dans l'immunsérum de lapin anti-milieu R.A.P. *L'immunsérum antipolytoxine staphylococcique* donnait au minimum 22 lignes, *l'immunsérum antihémolysine* 17 lignes, *l'immunsérum antifibrinolysine* 18 lignes et *l'immunsérum antilipasique* 17 lignes. En ce qui concerne *l'influence de l'acide pantothénique*, ces divers immunsérums nous ont donné respectivement et dans l'ordre : 22 - 20 - 21 - 20 lignes de précipitation. *Les sérums des animaux témoins* traités avec les substrats correspondants *dépourvus des toxines spécifiques*, nous ont donné entre 9 et 12 lignes de précipitation, donc *dans l'ensemble un nombre de précipitines inférieur à celui de l'immunsérum de lapin anti-R.A.P.*, ce qui prouve que notre raisonnement et les techniques mises en œuvre sont acceptables.

Les différents immunsérums possédaient *des précipitines spécifiques pour les antigènes proprement dits et pour les enzymes staphylococciques* éprouvées, s'étendant du groupe des α_1-globulines jusqu'à celui des γ-globulines. *Les anti-hémolysines* se trouvent surtout au niveau des α_1 - β_2 - et γ-globulines et nous insistons sur ces dernières parce que ceci parle en faveur de leur complexité.

Les antifibrinolysines précipitantes se situent surtout dans la zone des β-globulines, avec 1 ou 2 lignes supplémentaires dans la zone des serines-albumines.

Quant *aux précipitines antilipasiques*, nous les relevons surtout au niveau des α_2 et β_2-globulines, fait que nous avons essayé d'expliquer par leur spécificité pour *les lipoprotéines. Le traitement associé à l'acide pantothénique* a renforcé l'état d'immunité contre *ces différents antigènes et enzymes*. Cet effet stimulant s'est seulement manifesté dans *les immunsérums antipolytoxiniques* d'une façon qualitative, puisque le nombre de lignes de précipitation est *resté invariable* avec une intensité plus forte cependant. Quant *aux précipitines antihémolytiques, antifibrinolytiques et antilipasiques*, cet effet stimulant est plus marqué, puisque nous relevons dans chaque zone de précipitation *une ou deux lignes supplémentaires, ce qui prouve qu'une hyperimmunisation peut masquer l'influence de l'acide pantothénique*. D'autres auteurs ont déjà mentionné l'importance du mode d'immunisation, exigeant *un certain équilibre entre les doses d'antigène et d'anticorps* dans chaque système réactionnel, puis des doses relativement faibles à injecter pour l'étude de l'influence de *l'acide pantothénique* ou de tout autre facteur stimulant le processus immunologique.

Ce fait semble également confirmer *la conception actuelle de la dualité des anticorps spécifiques pour un même antigène qui peut contribuer à la genèse d'anticorps hémolysants, agglutinants, précipitants, etc.*

En ce qui concerne *le quatrième problème* qui nous a été posé, c'est-à-dire *l'étude de la complexité du groupe des γ-globulines.* nous pensons avoir pu apporter une contribution utile en indiquant l'existence de γ-globulines possédant indubitablement *des groupements déterminants distincts ou un nombre différent de ces groupements. La famille des γ-globulines* semble donc hétérogène, non seulement parce que les protéines qui la forment présentent, comme GRABAR l'exprime, « *une gamme de mobilité très étendue* », mais aussi parce qu'elles peuvent posséder dans certaines conditions des *déterminants antigéniques différents*, que certains immunsérums permettent de distinguer. Cependant ce n'est pas l'unique résultat qu'il faudrait souligner. Nous avons pu relever au cours de nos expériences que *les précipitines apparaissant au cours de l'acte immunologique dépendent de la spécificité constitutionnelle des différents antigènes, et ne s'extériorisent pas seulement dans la zone des* γ- et β_2-*globulines* comme l'immunologie classique le prévoyait jusqu'à présent, mais également à travers toutes les γ-globulines jusqu'aux sérines-albumines.

Nous sommes conscient du fait que le nombre de nos expériences et des animaux employés dans nos recherches est trop restreint pour nous permettre une conclusion péremptoire; pourtant de l'ensemble de ces recherches il nous paraît ressortir que *la réaction d'immuno-électrophorèse et des précipitines* mérite d'être étudiée sur une plus grande échelle, car elle pourrait rendre des services appréciables pour résoudre les problèmes immunologiques que nous avons soulevés et ceux concernant le rôle et l'intervention de l'acide pantothénique dans ces processus sérologiques.

BIBLIOGRAPHIE

(23) Bigger et coll. — Journ. Exp. Med., 1945, 49, 22.

(32) Breuseghem (Van). — C.R. Soc. Biol., 1934, 115, 1235 et 1237.

(40a) Bruni, Pernice et coll. Giorn. Batt. e Imm. 1939, 22, 42, et 1941, 26, 163. — Bollettino Soc. Ital. Biol. Sperim. 1958, 34, 415 et Giorn. Batt. Viro et Imm. 1962, 10, 1.

(10) Bryce et Burnet. — Journ. Path. and Bact. 1932, 35, 183.

(25) Bryce et Rountree. — Journ. Path. and Bact., 1946, 43, 173.

(13) Burky — Journ. of. Immunol. 1933, 24, 93.
Journ. of Bacteriol., 1937, 33, 48.

(8) Burnet. — Journ. Path. and Bact., 1929, 32, 717.

(9) Burnet et Freeman. — Journ. Path. and Bact., 1932, 35, 477.

(33a) Christie et Wilson. — Austria Journ. Exp. Biol. 1941, 19, 329.

(44) Courcon et Uriel. — Ann. Biol. Clin., 1958, N° 3-4, p. 181.

(37) Daranyi. — Centralblatt f. Bakt., 1928, 99, 74.

(2) Eckner L. — Recherches sur les antigènes staphylococciques. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg 1960.

(58) Elek S. D. — Staphylococcus pyogones and its relation to disease. Edit. Livingstone, Edimbourg et Londres, 1959.

(17) Fossmann. — Acta Path. and Microb. Scand., 1937, 468.

(50 a) Freund et Dermott. — Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 1942, 49, 548. Journ. Immunol., 1947, 56, 301.

(5) Gengou O. — Arch. Med. Exp., 1930, 4, 633 - 1931, 6, 211; - 1934, 9, 314.

(20) Gengou O. — Arch. Int. Med. Exp., 1934, 9, 413.

(31) Gengou O. — Ann. Inst. Pasteur, 1933, 51, 14.

(29) Gonzenbach et Uemura. — Centralblatt f. Bakt. und Paras. 1916, 78, 97.

(52) Grabar et Courcon. — Bull. Soc. Chim. Biol., 9958, T. XL, 1985.

(43) Grabar et Williams. — Biochem. Biophys. Acta, 1953, 10, 193; - 1955, 17, 67.

(59) Grabar J. (Mme), Toucas M. et Bonnefoi A. — Étude par précipitation en milieu gélifié des anticorps produits chez le lapin par diverses préparations de vaccins staphylococciques, Ann. Inst. Past. 1962, 103, 751.

(30) Gratia. — Arch. Int. de Physiol., 1921, 18, 355.

(11) Gross. — Centralblatt f. Bakt., 1930, 1 Orig., 115, 367.
Zeitschr. f. Immunit., 1931, 73, 14.

(4) Guillaume F. — Les anticorps précipitants dans les staphylococcies expérimentales. Leurs rapports avec la pantothénothérapie. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1962.

(48) Heymann et Wahlig. — Zeit. Immun. Forsch. und exp. Ther., 1958, 115, 185.

(7) Julianelle. — Journ. Inf. Dis., 1922, 31, 256.

(46) Kabat et Mayer. — Exp. Immun. Chem., 1953.

(28) Kleinschmidt. — Zeitschr. f. Immunit. Forsch., 1909, 3, 516.

(22) Kourilsky et Mercier. — Ann. Biol. Clin., 1949, 556, 173.

(41) Kroehne O. G. — Les ferments lipolytiques des Mycobactéries. Leurs caractères différentiels par rapport aux lipases pancréatiques et fongiques. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg 1961.

(18) Lewine. — Journ. Path. and Bact., 1939, 48, 291.

(24) Mercier et Pillet. — Ann. Biol. Clin., 1949, 7, 173.

(51) Moretti J., Boussier G., Hugon M. P. et Hartmann L. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, T. XLI, N° 1 p. 79.

(27) Much. — Biochem. Zeit., 1908, 14, 143.

(33) Murray-Fischer A. — Bull. John Hopkins Hosp. 1936, 59, 393.

(6) Neisser et Wechsberg. — Zeit. f. Hyg., 1901, 36, 399.

(57) Oeding P. — Bacter. Rev. 1960, 24, 374.

(56) Ostrom Y. — Rôle de l'acide pantothénique dans la formation de la Prothrombine et des facteurs de la coagulation du sang de lapin. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg. 1960.

(15) Panton et Valentine. — The Lancet 1932, 506.

(14) Parish et Clark. — Journ. of Path. and Bact., 1932, 35, 251.

(12) Parker, Weld et Gunther. — Journ. exp. Med., 1931, 44, 315.

(35) Pillet, Mercier et Pery. — Ann. Inst. Past., 1948, 75, 458.

(60) Pillet, Orta et coll. — Ann. Inst. Past., 1954, 86, 752. — 1959, 97, 353 et 1961, 100, 783.

(38) Ramon G., Richou et Ramon P. — C. R. Acad. Sc., 1945, 220, 341.

(50) Ramon, Amoureux et Pochon. — C. R. Soc. Biol. 25 avril, 1942.

(54) Rammelkamp, Badger et Dingle. — Journ. of. Inf. Dis., 1950, 86, 159.

(21) Richou R. — Rev. Immunol., 1949, 13, 162.

(42) Richou R., Chirol et Richou H. — C. R. Acad. Sc., 1961, 252, 3345.

(39) Richou R., Gerbeaux et Schlaepfer. — C. R. Acad. Sc., 1949, 229, 395 et 1175.

(40) Richou R., Quinchon C. et Richou H. — Rev. Path. Gén. et de Physiol. Clin. 1961. 725. 313.

(3) Ritschel-Beurlin G. — Les anticorps précipitants dans la poliomyélite. Leur rapport avec la pantothénothérapie. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg 1960.

(53) Saladin R. — Essai sur le sérodiagnostic du cancer. Son rapport particulier avec un système fibrinolytique. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1960.

(1) Sartory A., Sartory R. et Meyer J. — Microbiologie Pratique, Maloine, Paris, 1950.

(36) Saski et Feygin. — C. R. Soc. Biol., 1937, 126, 139.

(45) Scheidegger. — Int. Arch. Allergy, 1955, 7, 103.

(26) Smith et Brice. — Journ. Path. and Bact., 1938, 47, 161.

(16) Stookey. — Southerns Med. Journ., 1935, 28, 148.

(34) Tillet et Gardner. — Bact. Rev., 1938, 2, 161.

(19) Timmermann. — Journ. of Microbiol. and Serol., 1942, 8, 47.

(47) Uriel et Grabar. — Ann. Inst. Past., 1956, 90, 427.

(55) Villiger P. — Contribution à l'étude des lipases de Mycobacterium tuberculosis. Isolement et purification. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg 1961.

(49) Zander E. — Contrôle de la vaccination antipoliomyélitique par les réactions électrophorétiques et hémolysantes. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg 1962.

Vu, Strasbourg, le 22 octobre 1962

Le Président du Jury,

R. SARTORY

Vu et approuvé

Strasbourg, le 31 octobre 1962

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie

G. GAZET DU CHATELIER

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 31 octobre 1962.

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

Pour le Recteur

Le Vice-Président du Conseil de l'Université

M. NEDONCELLE

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5

PLAN DE TRAVAIL 7

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

Unicité ou pluralité de la toxine staphylococcique 9

CHAPITRE II

Évaluation du pouvoir pathogène des staphylocoques

Les propriétés enzymatiques toxigènes des Staphylocoques 15
Les hémolysines 16
La coagulase 18
La fibrinolysine 19
La gélatinolysine 21
Lipases staphylococciques 22
La caséinase 23
La lécithinase 24

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE III

Analyse immuno-électrophorétique en milieu gélosé

Purification de la gélose 25
Préparation des plaques 26
Préparation des immunsérums 27
L'appareillage 28
Coloration et décoloration 30
Immuno-électrophorèse en présence d'antigène staphylococcique 31

CHAPITRE IV

Examen des toxines employées seules ou associées à l'acide pantothénique

Technique de vaccination 37
Vaccination avec les toxines staphylococciques 40
Premier groupe 42
Deuxième groupe 43
Troisième groupe 44
Quatrième groupe 45
Cinquième groupe 46
Sixième groupe 47
Septième groupe 48

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 51

BIBLIOGRAPHIE 57

IMPRIMERIE DES DERNIERES NOUVELLES DE STRASBOURG - Dépôt légal no 2166/62